جامعة البعث

كلية الطب البيطري

قسم الأحياء الدقيقة

التقصّي عن الإشريكيّة القُولونيّة المُنتِجة للذيفان السّام لخلايا فيرو في بعض المنتجات الحيوانية

رسالة أعدت

لنيل درجة الماجستير في العلوم الطبية البيطرية

(أحياء دقيقة)

مقدمة ....

من الطبيب البيطري

محمد عبد الرزاق زهرة

دبلوم تحليل وتشخيص مخبري

بإشراف:

أ.م.د. سامر ابراهيم

أستاذ مساعد في التشخيص المخبري

2010

* شهادة *

أشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة هو نتيجة بحث قام به المرشح الطالب **محمد عبد الرزاق زهرة** تحت إشراف الدكتور **سامر ابراهيم** الأستاذ المساعد في قسم الأحياء الدقيقة في كلية الطب البيطري في جامعة البعث و أي رجوع إلى بحث آخر في هذا الموضوع موثق في النصّ.

المرشح	**المشرف العلمي**
محمد زهرة	**أ.م.د. سامر إبراهيم**

حرر في / /

Certificate

It is hereby certified that the work described in this thesis is the result of the author's own investigation ***Dr.Mohammad Zahra*** under the supervision of the ***professor Assistançe Dr.Samer Ibrahim*** in the Department of Microbiology at the Faculty of Veterinary Medicine, Al-Baath university, and any reference to other researcher work has been acknowledge in the paragraphs.

Date \ \

Candidate	**Supervisors**
Mohammad Zahra	***Prof. Assistance . Dr.Samer Ibrahim***

قرار لجنة الحكم والمناقشة

استناداً إلى قرار مجلس البحث العلمي والدراسات العليا بجامعة البعث رقم (١٤٨) المتخذ بالجلسة رقم (٧) للعام الدراسي ٢٠٠٩ - ٢٠١٠ المنعقدة بتاريخ ١٢ محرم ١٤٣١ هـ الموافق ٢٠٠٩/١٢/٢٨ القاضي بتشكيل لجنة الحكم والمناقشة لرسالة الماجستير للطالب محمد زهرة بعنوان :

" التقصي عن الاشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في بعض المنتجات الحيوانية "

وبعد عرض الرسالة وسردها ومناقشتها، اجتمعت لجنة الحكم والمناقشة بتاريخ ٢٢ / ٢ / ٢٠١٠ وبعد المداولة قررت اللجنة ترشيح طالب الدراسات العليا محمد زهرة لنيل درجة الماجستير في العلوم الطبية البيطرية اختصاص (الأحياء الدقيقة) بتقدير عام (جيد جداً) وبدرجة (٨٤,٥٠).

وتوصي اللجنة بصرف تكاليف طباعة الأطروحة على نفقة الجامعة نظراً للجهد الذي بذله الطالب والتكاليف التي تكبدها إضافة إلى تناوله موضوعاً حساساً من الناحية الاقتصادية في القطر.

أعضاء اللجنة :	التوقيع
أ. م. د. ناجح هبرة اختصاص تحليل وتشخيص مخبري " الأحياء الدقيقة " كلية الطب البيطري – جامعة البعث	
أ. م. د. سامر إبراهيم اختصاص الأحياء الدقيقة كلية الطب البيطري – جامعة البعث	
د. محمد عمار النبهان اختصاص صحة الألبان كلية الطب البيطري – جامعة البعث	

الأستاذ الدكتور عميد كلية الطب البيطري

بعد الإطلاع على الأطروحة المعدلة من رسالة الماجستير المقدمة من قبل المرشح لنيل درجة الماجستير في العلوم الطبية البيطرية طالب الدراسات العليا محمد زهرة في قسم الأحياء الدقيقة اختصاص (الأحياء الدقيقة) بعنوان :

" التقصي عن الاشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في بعض المنتجات الحيوانية "

نفيدكم بأن الأطروحة بشكلها الحالي قد استوفت التعديلات التي أشارت لها لجنة الحكم والمناقشة التي عقدت يوم الأثنين بتاريخ ٢٢ / ٢ / ٢٠١٠ لمناقشة الرسالة، ونعتبر أن الرسالة بهذه الصورة جاهزة للطباعة بشكلها النهائي.

يرجى التكرم بالإطلاع

٢٤/ ٢/ ٢٠١٠

عضو	عضو	رئيس اللجنة
د. محمد عمار النبهان	أ. م. د. سامر إبراهيم	أ. م. د. ناجح هبرة

عميد كلية الطب البيطري

الدكتور

عبد الكريم قطب اللوز

٢٤ / ٢ / ٢٠١٠

تصريح

أصرح بأن هذا البحث والذي هو بعنوان (**التقصّي عن الإشريكيّة القُولونيّة المُنتِجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو في بعض المنتجات الحيوانية**) لم يسبق له أن قبل للحصول على أية شهادة ولا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

التاريخ / /

المرشح

محمد عبد الرزاق زهرة

Declaration

It is declared that this work (***Detection of Verocytoxigenic E.coli in some animal products***) has not been accepted already for any degree , nor is being submitted concurrently for other degree .

Date \ \

Candidate

Mohammad Zahra

وقفة شكر وعرفان

لم يكن مقدرا لهذه الرسالة أن تصل إلى هذه المرحلة لولا فئة من الطيبين، لا أستطيع أن أذكرهم كلهم ولا أن أوفيهم حقهم بحبر على ورق ولكن هذا أضعف الإيمان. وبادئ ذي بدء لا يسعني إلا أن أشكر جامعة البعث وكلية الطب البيطري فيها عمادة وإدارة حيث لم يدخروا جهدا لدعم البحث العلمي ودعم الروح العلمية في الكلية ولا أنسى بالشكر أعضاء الهيئة التدريسية كاملين متذكرا كل الجهود التي بذلت من أجلي و من أجل زملائي على المدى السنين الماضية من دراستي وأشير هنا وأتوجه بالشكر الشديد إلى قسم الأحياء الدقيقة الذي كان المحطة التي اخترتها لأكمل فيها هذه المرحلة. ولا يسعني إلا أن أذكر الجهود الخفية التي ساعدتني على مر السنوات الماضية والتي بذلها أعضاء الفنية في كلية الطب البيطري من معيدين ومخبريين وأخص بالشكر مخبر الغاو. ونهايةً أشكر من عمل معي يدا بيد ليذلل الصعاب ويمهد الطريق ويقوم مسيرتي في هذا البحث أخي الكبير **الدكتور سامر إبراهيم** المشرف على هذا النتاج العلمي والراعي الحقيقي لمسيرتي العلمية منذ كنت طالباً في مرحلة الدبلوم، حيث مثل بالنسبة لي قنديلاً حقيقياً على كافة الأصعدة.

كما أتوجه بالشكر الجزيل **لمديرية الصحة الحيوانية** في دمشق وأختص بالذكر **قسم أمراض الدواجن** بكامل كادره، حيث كانوا من أهم الداعمين والمشجعين لي في جميع مراحل البحث.

محمد

2010

الفهرس

قائمة الاختصارات

AEL	Attaching And Effacing Lesion	الآفات الطامسة والماحية
EB S	Ethidium Bromide Stain	صبغة الإيثيديوم بروميد
EHEC	EnteroHemorrhagic *E.Coli*	الإشريكيّة القولونيّة النّزفيّة المعويّة
EPEC	EnteroPathogenic *E. Coli*	الإشريكيّة القولونيّة الممرضة للأمعاء
ETEC	EnteroToxigenic *E.Coli*	المنتجة للذيفان المعوي
GB3	Globotriaosylceramide	
GB4	Globotetraosylceramide	
HACCP	hazard analysis critical control point	نظامُ نِقاطِ التَّحكّمِ الحرجَةِ لتَحليلِ المَخاطِر
HC	Hemorrhagic Colitis	التهاب القولون النزفي
HUS	Hemolytic-Uremic Syndrome	متلازمة انحلال الدم اليوريمية
MEM	Minimum Essential Medium	بيئة الاحتياجات الأساسية
NTEC	Necrotoxigenic *E.coli*	الإشريكيّة القولونيّة المنتجة لذيفانات التنخر
SF	Sorbitol fermenting	تخمير السوربيتول
SLT-I	Shiga Like Toxin-I	الذيفان شبيه الشيغا-1
SLT-II	Shiga Like Toxin-II	الذيفان شبيه الشيغا-2
SMAC	Sorbitol MacConkey Agar	آغار ماكونكي بالسوربيتول
STEC	Shiga Like Toxin *E.Coli*	الإشريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان شبيه الشيغا
TBE	Tris-Borate-EDTA	
TSI	Triple Sugar Iron Agar	وسط آغار ثلاثي السكر بالحديد
VCA	Vero Cell Assay	خلايا فيرو
VT	Vero toxin	ذيفان فيرو
vt, vt_1, vt_2	Vero toxins genes	الجينات المشفرة لذيفان فيرو
VT1	Vero toxin-1	ذيفان فيرو-1
VT2	Vero toxin-2s	ذيفان فيرو-2
VTEC	VerocytoToxigenic *E.Coli*	الإشريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو
NSF	None Sorbitol fermenting	غير مخمرة للسوربيتول
bp	Base pair	أساس آزوتي

1- المقدمة

Introduction

1- المقدمة : Introduction

عزلت الإشْريكيَّة القولونيَّة لأول مرة من قبل العالم الألماني **اشرش** عام 1885 من براز الأطفال، وهي جراثيم متعايشة في الأمعاء وتشكل النسبة العظمى من جراثيم الأمعاء عند البالغين ولا يفوقها في العدد إلا العصيات اللاهوائية المجبرة. ومن ميزاتها أنها تشكل مستعمرات على مخاطيات الأمعاء والقولون وتسبب أعراضاً مختلفة، وتدخل الجسم عن طريق الغذاء خلال عدة ساعات بعد الولادة، ولبعض ذراريها عوامل فوعة مختلفة قد تسبب أمراضاً مختلفة عند الإنسان والحيوان، وتعتبر السبب الرئيسي للإسهال، وخاصة إسهال المسافرين الذي يستمر (1 – 3) يوماً، وهي سبب شائع لإنتانات الجهاز البولي حيث قد تسبب التهاب الإحليل أو المثانة أو التهاب الحويضة والكلية كما يمكن أن تسبب داء القولونيات *Colibacillosis* والإنتان الدموي القولوني *Colisepticemia* عند الدواجن كما تسبب التهاب الضرع عند الأبقار والماعز والأغنام والتهاب القناة المعوية للصيصان والرومي. وتُقسَم الإشْريكيَّة القولونيَّة مصلياً بالاعتماد على المستضّد الجسدي *O* والهُدبي *H* وأحياناً المِحفظي *K* ومجموعها يحدد النَمَط المَصْليّ الواحد للإشريكية القولونية *Serotype*. **(كردي وزملاءه.، 2007)**

وبناءً على الخواصّ السُّمية *toxigenicity* تُصنَّف الإشْريكيَّة القولونيَّة إلى مجموعات مُتمايزة تضمُّ: الذراري المنتجة للذيفان المعوي *Enterotoxigenic E.coli* (***ETEC***)، والذراري المنتجة للذيفان السَّام لخلايا فيرو *Verocytotoxigenic E.coli* ***VTEC*** والتي تنتج الذيفانات السامة لخلايا فيرو (الذيفان السام لخلايا فيرو-1 والذيفان السام لخلايا فيرو-2 ومتغايراتهما) وتسبب بعض ذراري هذه المجموعة أمراضاً في الإنسان والحيوان، ويطلق على الذراري التي تفرز الذيفانات السامة لخلايا فيرو وتسبب أمراضاً في الإنسان بالإشْريكيَّة القولونيَّة النزفيَّة المعويَّة *Enterohaemorrhagic E.coli* ***EHEC***، والذراري المنتجة لعوامل التنخُّر *Necrotoxigenic E.coli* ***NTEC***، وذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة الممرضَة للأمعاء *Enteropathogenic E.coli* ***EPEC***. **(Wani *et al.*, 2004)**

وتعتبر الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو مسبب مرضي منقول بالغذاء حديث الاكتشاف نسبياً، وتسببت بالعديد من الأوبئة والحالات الفردية على حد سواء في جميع

أنحاء العالم، وإنّ ارتفاع نسبة الإصابة والوفاة بها سلّطت الضوء على الخطر الكبير الذي تشكّله على الصحة العامة، حيث كانت الـ VTEC موضوع بحث ودراسة عميقين منذ اكتشافها عام 1982، وأشارت جميع الأبحاث إلى أن عامل الضراوة الأهم الذي تملكه الجرثومة هو الذيفان السام لخلايا فيرو VTs.**(OIE, 2008)**

وتعتبر كل من متلازمة انحلال الدم اليوريمية والتهاب القولون النزفي من أكثر أمراض الإنسان المترافقة بتواجد الإشْريكِيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو. وكما تعتبر المجترّات الثوي الخازن الرئيسي للإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو بين الحيوانات، حيث تعدُّ المصدر الأول لأي إصابة بشرية بهذا المسبب، وتعد منتجات اللحوم والحليب الملوثين بالجرثومة هي الآلية الأساسية التي تنتقل بها الجرثومة للإنسان. **(Rhoades *et al.*, 2009)**

وبسبب الخطورة البالغة للمسبب وما يشكله من تهديد جدي على صحة البشر، فقد تطورت الإجراءات التشخيصية بشكل ملفت للنظر وخاصة في العقد الأخير، وتعددت الطرق والسبل التي نستطيع من خلالها الكشف عن المسبب ومفرزاته، وتشخيصه في طيف واسع من أنواع العينات. ومنها طرق الزرع الجرثومي، مثل الزرع على وسط آغار ماكُونكي بالسوربيتول ووسط آغار ماكُونكي العادي، بالإضافة للطرق التي تمكن من الكشف عن النمط المصلي للذراري المعزولة مثل اختبار التراص، وهناك الطرق التي تمكن من الكشف عن امتلاك ذراري هذه المجموعة لعوامل الضراوة مثل اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو الذي يكشف عن التأثير القاتل للذيفان السام لخلايا فيرو الذي تنتجه هذه الجرثومة على هذا المنبت، بالإضافة للطرق التي تعتمد التقانات الجزيئية للكشف عن الجينات المشفرة لعوامل الضراوة التي تملكها الجرثومة مثل اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.**(Smith and Scotland, 1993)**

أهداف البحث : *The Purposes*

نظراً لعدم وجود دراسة أكاديمية حول هذا الموضوع بالرغم من الخطورة البالغة له وخاصة على الصحة العامة فإنّ هذا البحث هو الأول من نوعه في سورية والذي يهدف إلى :

1- التقصّي عن الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في أكثر المنتجات الحيوانية تداولاً في السوق السورية (الذبائح، الهمبرغر، الشاورما، الألبان)، نظراً لما تشكله هذه الجرثومة من خطورة بالغة تهدد الصحة العامة.

2- معرفة الدور الذي تلعبه الأبقار والأغنام السليمة كأثوياء خازنة للـ VTEC وذلك بالكشف عن الـ VTEC في براز هذه الحيوانات.

3- معرفة شاكلة عوامل الضراوة التي تملكها الذراري المعزولة باستخدام اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد PCR للكشف عن الجينات المشفرة لكل من الذيفان السام لخلايا فيرو-1 و-2.

4- الكشف عن النمط المصلي O157:H7 بين ذراري الـ VTEC المعزولة نظراً لخطورته البالغة على الصحة العامة.

2- الدراسة المرجعية

Review Of Literature

يرجع مُصطلَح الشيغا لعام 1898، عندما وصَف **كيوشي شيغا** الجراثيم التي تسبب مَرض الزُحار *Dysenteriae* في الإنسان، ومن هنا أتت تسمية هذه الجَراثيم بالـــ الشِّيغيلَة الزُحارِيَّة-النَّمَط-1 type-1 *Shigella dysenteriae*. في حين كان **كونرادي** (**Conradi, 1903**) هو أول من كشف عن مَقدِرَة هذه الجراثيم على إفراز ذيفان الشيغيلَةِ الزُحارِيَّة *Shiga Toxin*، حيث أبلغ أنَّ الحقنَ الوريدي لخلاصة عصيّات الشيغا (الشِّيغيلَةُ الزُحارِيَّةُ-النَمَط-1) يسبب الخَزل *Paresis* (شلل خفيف أو جزئي) والموت للأرانب.

وُصِفت مُتَلازِمَةُ انحِلالِ الدَّمِ-اليوريمية *Hemolytic-Uremic Syndrome* (**HUS**) كمرضٍ يصيب الإنسان لأول مرة من قبل **غاسير وزملاءه** (**Gasser *et al.*, 1955**)، وهذا المرض مرافق لكل من أعراض فقْر الدَّمِ الانْحِلالِيّ *Hemolytic Anemia*، وقِلَّةُ الصُّفَيحات *Thrombocytopenia*، والفَشَل الكُلْوِيّ الحادّ *Acute Renal Failure*، وكانت مرافقة للعدوى بالشِّيغيلَة الزُحارِيَّة-النَّمَط-1. أما ترافق مُتَلازِمَة انْحِلال الدَّمِ-اليوريمية مع الإصابة بالإشْريكِيَّة القولونِيَّة فقد ذُكِرَ للمرة الأولى في جنوب إفريقيا عندما أشار **كيبل وبرنارد** (**Kibel and Barnard, 1968**) إلى احتمال أن تكون ذرّية طافِرَة *Mutant* من الإشْريكِيَّة القولونِيَّة الممرضة للأمعاء هي المسبب لهذه المتلازمة.

أشار **كانتي وزملاءه** (**Cantey *et al.*, 1977**) إلى أن الدراسات الرائدة التي قادت لاكتشاف ذيفانات شبيهة الشيغا التي تفرزها الإشْريكِيَّة القولونِيَّة كانت تركز في البداية على مجموعة الإشْريكِيَّة القولونِيَّة المُمْرِضة للأمْعاء *EnteroPathogenic E. Coli* (**EPEC**) التي تسبب الإسهال في صغار الأرانب والإنسان، فقد كانت إمْراضيّة هذه المجموعة غير واضحة. حيث أنها غير غَزْوِيَّة للأمعاء *Not Enteroinvasive* ولا تملك الذيفانّات المِعَوِيّة العَطوِبة بالحَرارَة *Heat-Labile Enterotoxins* والصامِدة بالحَرارَة *Heat-Stable Enterotoxins*. وقد استهدفت هذه الدارسات البحث عن قدرة ذراري مختارة من الإشْريكِيَّة القولونِيَّة، على إفراز ذيفان شبيه الشيغا *Shiga Like Toxin* (والذي كان يعرف حتى ذلك الوقت بالذِّيفَان السام لخَلايا هيلا *Hela Cells* - سُلالَة مِنَ الخَلايا الوَرَمِيَّة – وتمكن الباحثين في ذلك الوقت من معادلة أثره بواسطة ضِدُّ الذِّيفَان الأرنبي

المحضر ضدّ خلاصة ذيفان الشيغا). وأثبت أوبرين وزملاءه (**O'brein *et al.*, 1977**) أن هناك بعض ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المُمْرِضة للأمْعاء قادرة على إفراز مثل هذا الذِّيفَان.

كان العمل العلمي الأبرز والأهمّ الذي كشف النقاب عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو، هو البحث الرائد الذي قام به **كونواكشوك وزملاءه** (**Konowalchuk *et al.*, 1977**)، حيث لاحظوا أثناء تجاربهم التي كانوا يقومون بها لاستبيان مدى فائدة المنبت الخلوي أحادي الطبقة لخلايا فيرو *Vero Cells* (خلايا كلية القرد الإفريقي الأخضر) في الكشف عن الذِّيفَان العَطوبْ بالحَرارَة الذي تنتجه الإشْريكيَّة القولونيَّة، أنَّ هناك ذيفان سامّ للخَلايا *Cytotoxic* في الرشاحات المزرعية لعدد من ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة مختلف تماماً عن الذِّيفَانين المعويين الصامِد بالحَرارَة والعَطوبْ بالحَرارَة اللذان تنتجهما هذه الجرثومة، حيث كان ساماً لخلايا فيرو ولكن ليس لخلايا Y-1 وخلايا CHO (خطوط خلوية)، وكان تأثيره على خلايا فيرو مختلفاً تماماً عن تأثير الذِّيفَان العَطوبْ بالحَرارَة. بالإضافة لكونه مقاوماً للحرارة ومُختلف مُستَضِدِّياً عن الذِّيفَان المعوي العَطوبْ بالحَرارَة، وقُدِّرَ وزنه الجُزيئي آنذاك بالتَرْشيح الغشائي بين الـ 10.000 - 30.000 دالتُون (وَحْدَةُ الكُتْلَةِ الذرّية). وتمّ الكشف عن هذا الذِّيفَان في الرشاحة المزرعية لـ 10 ذراري من أصل 136 ذرّية مختبرة للإشْريكيَّةُ القولونيَّة أحدثت تغيرات مرضية في المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو. ثمانية من تلك العشر ذراري كانت مترافقة بحالات إسهال (سبعة في الأطفال الرضّع وواحدة في الخنازير المفطومة)، واثنتين منها عزلتا من الجبن ولم تترافق سابقاً مع أي حالة مرضية. ووصفوا التأثير السمي لهذا الذيفان على المنبت الخلوي أحادي الطبقة لخلايا فيرو على شكل تكوُّر وانكماش لخلايا فيرو مع انسلاخها عن سطح المنبت، وظهور العديد من الخلايا الطافية في المُستَنْبَت الزَرْعِيّ، وزيادة هذا التأثير مع مرور الوقت. وأشاروا إلى أنَّ التمييز بين تأثير الذيفانْ السّام لخلايا فيرو عن تأثير الذِّيفَان المعوي العَطوبْ بالحَرارَة على المنبت الخلوي أحادي الطبقة لخلايا فيرو يتمّ بسهولة، فالذِّيفَان المعوي العَطوبْ بالحَرارَة مُوَتِّر للخلايا CytoTonic، ويظهر تأثيره على شكل تضخم بالخلايا وثخانة في جدرانها، وتصبح الخلايا سَهْلَة الانْكِسار *Refractile*. وتختفي التغيرات المرضية مع مرور

الوقت، وتظهر الطبقة الأحادية للخلايا طبيعية. في حين أن الذيفانْ السّام لخلايا فيرو قاتل للخلايا CytoToxic والتغيرات التي يحدثها غير عكوسة. وقاموا بتسمية هذا الذِّيفَان بـ **الذيفانْ السَّام لخلايا فيرو Vero Cytotoxin VT**، وتسمية الذراري التي تفرزه **بالإشْريكِيَّة القولونِيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC** VerocytoToxigenic *E.Coli*.

حقق **ريلي وزملاءه (Riley *et al.*, 1983)** في وبائين بمرض مَعدِي مِعوَي غير طبيعي (التِهابُ القَولون النَزْفِيّ *Hemorrhagic Colitis*) أصاب 47 شخص في الولايات المتحدة الأمريكية. ووصفوا الأعراض السريرية للمرض بألم شديد ناتج عن مغص بطني *Severe crampy abdominal pain*، إسْهال مائِيّ *Watery diarrhea* في البداية يتطور إلى إسْهال مُدَمّى، مع أو بدون حمى. وتَرافق المرض مع تناول شطائر الهمبرغر من سلسلة لمطاعم الوجبات السريعة في ولايتين. ولم تشر نتائج الزرع الجرثومي للروث إلى أي مسبب مرضي معروف، ولكن تمّ عزل نوع نادر من الإشْريكِيَّة القولونِيَّة من النَمَط المَصلِيّ O157:H7، والتي كانت غير غَزْوِيّة للأمعاء *Not Enteroinvasive* وغير منتجة للذيفانات المعوية (بالاختبارات الروتينية)، وذلك من 9 عينات برازية من أصل 12 عينة تم جمعها خلال أربع أيام من ظهور المرض في كلا الولايتين، ولم يتم عَزل هذه الجرثومة من البراز المجموع بعد 7 أيام من ظهور المرض. كما عزلت أيضاً من لحوم الأبقار من مطاعم الوجبات السريعة في ولاية ميتشغان. وتأتي أهمية هذا البحث من كونه أول تقرير علمي يصف ترافق الْتِهاب القَولون النَزْفِيّ مع الإشْريكِيَّة القولونِيَّة من النَمَط المَصلِيّ O157:H7، بالإضافة لذكره أن اللحوم البقرية غير المطهية بشكل جيد ربما تكون مصدر العامل المسبب في حدوثه.

بيّن ويلس وزملاءه (Wells *et al.*, 1983) أنّ جميع الذراري المعزولة من الوباء السابق كانت غير غَزْوِيّة للأمعاء *Non-Invasive* وليست منتجة للذِّيفانات *Non-Toxigenic* بواسطة الاختبارات القياسية، وتملك جميعها نَمَطاً حَيَوِيّاً فريداً *Biotype*. وأشارت نتائج تحليل شَواكِل البلازميدات *Plasmide Profile* إلى أنّ جميع الذراري المعزولة من الـ O157:H7 شديدة التشابه فيما بينها ومتطابقة في تفاعلاتها الكيمياحيوية مع تلك الخاصة بالإشْريكِيَّة القولونِيَّة النموذجية، باستثناء خاصية تخمير سكر السوربيتول

Sorbitol Fermentation، حيث كانت جميع ذراري الــ O157:H7 المعزولة غير مخمرة للسوربيتول، في حين أنّ 93% من ذراري الإشْريكِيَّة القولونيَّة النموذجية مخمرة للسوربيتول. وعند مقارنة ذراري الــ O157:H7 المعزولة من الأوبئة السابقة مع تلك الموجودة في مكاتب أرشفة ذراري الإشْريكِيَّة القولونيّة في الولايات المتحدة الأميركية والتابعة لكل من مخابر وزارة الزراعة وقسم الأبحاث البيطرية في بنسلفانيا ومخابر مركز التحكم والوقاية من الأمراض، تبيَّن حدوث تطابق واحد (من أصل 3000 ذرية) مع ذرية *E.Coli* O157:H7 موجودة في مركز التحكم والوقاية بالأمراض، وكانت هذه الذرية قد عزلت من حالة إسهال دموي شديد عام 1975 (تم إنشاء المكتبة في عام 1973). واستخلصوا من هذه النتائج أن الــ O157:H7 هي العامل المسبب لالتهاب القولون النزفي في كلا الوبائين.

وظلّت العلاقة التي تربط بين الإشْريكِيَّة القولونيَّة O157:H7 والذيفان السام لخلايا فيرو مجهولة، إلى أن أبلغ **أوبرين ولافيك (O'Brien and Laveck, 1983)** عن إنتاج الإشْريكِيَّة القولونيَّة O157:H7 للذيفانات شبيهة الشيغا Shiga Like Toxins، حيث برهنا على مقدرة ذراري الإشْريكِيَّة القولونيَّة O157:H7 المَعزولة من الوباء الذي ظهر في الولايات المتحدة الأمريكية عام 1982 على إنتاج مستويات عالية من ذيفانات سامّة Toxic لكل من خلايا هيلا وخلايا فيرو، وتمكنوا من معادلة أثرها السام على هذه الخلايا بواسطة ضِدّ الذِّيْفَان الأرنبي المحضَّر لذيفان الشيغا الذي تنتجه الشِّيغيلَةُ الزُحارِيَّةُ-النَّمَط-1 ومن هنا أتت تسميتها بــالذيفانات شبيهة الشيغا. وكشفا احتواء الرشاحة المزرعية لذراري الــ O157:H7 المعزولة على نوعين من الذيفانات، الأول سامّ لكل من خلايا فيرو وهيلا ويتم معادلة أثره السام تماماً بواسطة ضِدُّ الذِّيْفَان الأرنبي المحضَّر لذيفان الشيغا واصطلحا تسميته **بالذيفان شبيه الشيغا-1 (SLT-I)** Shiga Like Toxin-I، في حين أن الثاني سامّ لهذه الخلايا ولكن لا يتم معادلة أثره كلياً بضِدُّ الذِّيْفَان الأرنبي المحضَّر لذيفان الشيغا واصطلحا تسميته **بالذيفان شبيه الشيغا-2 (SLT-II)** Shiga Like Toxin-II. كما اصطلحا تسميةَ الذراري التي تنتج هذه الذيفانات **بالإشْريكِيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان شبيه الشيغا STEC** Shiga Like Toxin *E.Coli*. وعند مقارنتهم لهذه الذيفانات مع تلك التي تنتجها الذراري

التي اختبرها **كونواكشوك وزملاءه** تبين تطابق الذيفانات التي تنتجها كلا المجموعتين. ما يعني انتماء كلا المجموعتين من هذه الذراري إلى نفس المجموعة المرضية PathoGroup الجديدة من الإشْريكيَّة القولونيَّة، والتي اعتمد كل مجموعة من الباحثين تسميتها Nomenclature تبعاً للطريقة التي اكتشفها بها.

كشفَ كاراماللي وزملاؤه (Karamali *et al.*, 1983) عن وجود ذيفان سامّ لخلايا فيرو، وأخفُّ تأثيراً على خلايا هيلا، في الرشاحات المزرعية للعزولات البرازية من الإشْريكيَّة القولونيَّة المأخوذة من 8 حالات من أصل 15 حالة مصابة بمُتَلاَزِمَة انْحِلاَلِ الدَّمِ--اليوريمية **HUS**. حيث تم البحث عن الذيفانْ السَّام لخلايا فيرو البرازي في 5 من هؤلاء المرضى، وكانت جميعها إيجابية. وفي 7 مرضى من أصل 15 مريض الذين أعطوا نتائج سلبية لوجود الذيفان، كانت عينتان إيجابيتان للفحص البرازي للذيفان، في حين أعطت عينة ثالثة منهم نتائج مصلية قوية تشير إلى إصابته بالإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو. وتشكل هذه الدراسة التي ثبت فيها ترافق 11 حالة من أصل 15 (73%) حالة بمُتَلاَزِمَة انْحِلاَلِ الدَّمِ-اليوريمية مع الإشْريكيَّة القولونيَّة المفرزة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو، أول تقرير علمي يربط بين الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو ومُتَلاَزِمَةُ انْحِلاَلِ الدَّمِ-اليوريمية التي تصيب الإنسان.

كان يعتقد أن الزمرة المصلية O157 تمثل كامل مجموعة الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو، ويعود ذلك لأنها كانت الأولى المكتشفة من هذه المجموعة والتي تسبب كلاً من مُتَلاَزِمَة انْحِلاَلِ الدَّمِ-اليوريمية والتهاب القولون النزفي بالإضافة لإمكانية تشخيصها وتمييزها مخبرياً نتيجة امتلاكها خصائص كِيميائيَّة حَيَويَّة فارقة. لاحقاً أثبت خطأ هذا الاعتقاد، مع الإبقاء على أهمية الزمرة المصلية O157، حيث تم تصنيف الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC إلى قسمين رئيسين: الزمرة المصلية VTEC O157 من جهة والتي تم التركيز عليها بشكل رئيسي في الأبحاث، وذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو التي لا تنتمي للزمرة المصلية O157 VTEC Non-O157 من جهة أخرى. والتي بقيت مهملة لفترة طويلة نتيجة لعدم معرفة

أهميتها أولاً وعجز التقانات التشخيصية المتوافرة في ذلك الوقت عن تمييزها ثانياً .(Pai *et al.*, 1984)

صُكّ مصطلح **الإشْريكيّة القولونيّة النَزْفيّة المِعَويّة** ***EnteroHemorrhagic E.Coli*** (**EHEC**) على يد **ليفن وايدلمان** (**Levine and Edelman, 1984**). واستخدماه ليضمَّ ذراري الإشْريكيّة القولونيّة التي تسبب كلا من الْتِهابُ القَولون النَزْفِيّ ومُتَلاَزِمَةُ انْحِلاَلِ الدَّمِ-اليوريمية في الإنسان، وتنتج الذيفانات السامة لخلايا فيرو (VT1, VT2)، وتسبب الآفات الطامسة والماحية Attaching And Effacing Lesion (**AEL**) عند التصاقها بالخلايا الظهارية للأمعاء، وتملك بلازميدة وزنها الجزيئي 60 MDa (ميغا دالتون= 10^6 دالتون). ولهذا فإنّ هذه التسمية تعبر عن مجموعة فرعية Subset محددة من الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فِيرو، تترافق ذراريها مع حالات مرضية بشرية. حيث أنّ ذراري الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فِيرو ليست جميعها ممرضة، في حين أنّ جميع ذراري الإشْريكيّة القولونيّة النَزْفِية المِعَوِيّة والتي تنطبق عليها جميع الصفات المشار إليها سابقاً تعتبر ممرضة للإنسان.

وفي دراسة لمعرفة مدة بقاء (بُقيا) Survival الإشْريكيّة القولونيّة النمط O157:H7 المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو بدرجات الحرارة المختلفة، وتحديد الدرجة المثلى لنموها، **وجد دويل وسشويني** (**Doyle And Schoeni, 1984**) أنّ الإشْريكيّة القولونيّة O157:H7 في اللحوم البقرية المفرومة أكثر حساسية لدرجات الحرارة المرتفعة من السَّلْمونيلَة، ولكنها كانت أكثر تحملاً لدرجات الحرارة المنخفضة منها، حيث بقيت حية لمدة 9 أشهر في الدرجة – 20 مْ، مع نقص طفيف في أعدادها. وكان نموها جيداً على وسط مرق الصويا المغذية بين الدرجتين 30 و 42 مْ، ولكن الدرجة المثلى لنموها كانت 37 مْ. وكان نمو الـــ O157:H7 ضعيفاً عند الدرجة (44 – 45.5 مْ) والتي غالباً ما كانت تستعمل لعزل جراثيم الإشْريكيّة القولونيّة من الأغذية.

تقصّى كارمالي وزملاءه[a] (**Karamali *et al.*, 1985**) عن الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فِيرو في 40 حالة لمُتَلاَزِمَة انْحِلاَلِ الدَّمِ-اليوريمية مجهولة السبب. وتمَّ

الكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في العينات البرازية (والتي تنتمي على الأقل لــ 6 زُمَر مَصْلِيَّة *SeroGroup* للمُسْتَضِدّ الجَسَدِيّ O، بما فيها O26 - O111 - O113 - O121 - O145 - O157) أو عن الذيفانات السامة لخلايا فيرو الحرة البرازية أو عن كلتيهما معاً في 24 (60%) من الحالات. ودلّت نتائج الدراسة على أن 30 (75%) من المرضى كانوا مصابين بالإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو بمعيار أو بآخر، وأكدوا في هذه الدراسة ما توصلوا إليه سابقاً، عن وجود ترافق مهم ومعنوي بين مُتَلازِمَةُ انْحِلاَلِ الدَّمِ-اليوريمية مجهولة السبب والإصابة بالإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو. وأشاروا إلى أنّ التقصّي عن الذِّيفَان الحرّ في البراز أحد أهم الإجراءات التي يجب إتباعها في التشخيص المبكر للإصابة، وذلك لأنه - حسب الدراسة التي قاموا بها - لم تعزل الجرثومة في غياب الذِّيفَان البرازي، في الوقت الذي كان ممكناً فيه التقصّي عن الذِّيفَان الحر في البراز، في وجود الجرثومة بمستويات غير قابلة للعزل والاستنبات.

وفي خطوة رفعت من حساسية اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو كأداة تشخيصية للكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو المترافقة مع حالات متلازمة انحلال الدم اليوريمية، تمكن **كارمالي وزملاءه (Karmali *et al.*, 1985)**[b] من تحرير عيارات Titers عالية من الذيفانْ السَّام لخلايا فيرو من جراثيم الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو وذلك بتحضين المستعمرات النامية في وسط مرق الصويا المغذية المضاف إليه سلفات البوليميكسين - ب polymyxin B sulphate (0.1 ملغ/مل) لمدة نصف ساعة بالدرجة 37 مْ. وكان العيار الأعظمي للذيفان المحرر بالبوليميكسين منتجاً من الجراثيم المحضّنة لمدة 5 ساعات في هذا الوسط. واستنتجوا أن استخدام سلفات البوليميكسين-ب في اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، يجعل من الاختبار طريقة عالية الحساسية للكشف عن وجود الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو VTEC بتراكيز ضئيلة في العينات البرازية المأخوذة من المصابين بمتلازمة انحلال الدم اليوريمية. وأشاروا إلى إمكانية تعميم هذه الطريقة لتكون ذات قيمة عالية في الدراسات الوبائية التي تتقصّى عن وجود الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان

السام لخلايا فيرو في جميع أنواع العينات وخاصة تلك التي توجد فيها الجرثومة بمستويات منخفضة مثل العينات الغذائية، البيئية، أو تلك المأخوذة من روث الحيوانات.

تمت الاستفادة من خاصية عدم تخمير السوربيتول التي تمتاز بها الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو O157:H7 عن بقية مجموعة الإشْريكيَّة القولونيَّة، في صنع وسط خاص بالكشف عنها. حيث قام **مارش وراتنام (March and Ratnam, 1986)** بإجراء تعديل بسيط لوسط آغار ماكُونكِي MacConkey Agar الخاص بالإشْريكيَّة القولونيَّة تضمنت إضافة سكّر د-السوربيتول D-Sorbitol بدلاً من اللاكتوز بنسبة 1% إلى الوسط المزرعي ليصبح وسط آغار ماكُونكِي بالسوربيتول **SMAC** Sorbitol MacConkey Agar. ثمّ قاموا بتجربته للتقصّي عن الإشْريكيَّة القولونيَّة O157:H7 في العينات البرازية (1000 عينة). حيث تم تحضين العينات على الوسط لمدة ليلة واحدة بالدرجة 37 مْ ، وتم عزل الـ O157:H7 من 18 عينة منها ، كانت جميعها من مرضى مصابين بإسهال مدمّى. وفي كل حالة منها كان نمو الـ O157:H7 شديداً على وسط آغار ماكُونكِي بالسوربيتول، حيث نَمت الجرثومة على شكل مستعمرات نقية، شفافة، رمادية أو شاحبة نتيجة كونها غير مخمرة للسوربيتول. بالمقارنة مع الإشْريكيَّة القولونيَّة البرازية التي نمت بشكل مستعمرات زهرية أو وردية اللون على هذا الوسط نتيجة تخميرها للسوربيتول. وبلغت حَسَاسيَّة *Sensitivity* وسط آغارُ ماكُونكِي بالسوربيتول في التقصّي عن الـ O157:H7 100%، والنَوْعِيَّة *Specificity* 85% ، والمَضْبوطِيَّة (الدقة) *Accuracy* 86%. وخرجوا بنتيجة أن هذا الوسط يشكل طريقة بسيطة، رخيصة، سريعة، موثوقة، للتقصي عن الإشْريكيَّة القولونيَّة O157:H7 ونصحوا باستعماله في المخابر البشرية كإجراء روتيني في حالات الإسهال المدمّى.

أجري أوّل بحث عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157:H7 في المنتجات الغذائية للحوم من قبل **دويل وسشويني(Doyle and 1987 Schoeni,)** حيث قاموا بجمع عينات من أنواع مختلفة من اللحوم الطازجة (أبقار، أغنام، دجاج، خنازير) واختبارها لوجود الـ VTEC O157:H7 وذلك باستخدام طرق مزرعية انتقائية خاصة بالـ O157:H7 أولاً، ثم أجرو التنميط المصلي لجميع المستعمرات الإيجابية،

ولاحقا تم إجراء اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو لاختبار مقدرة الذراري على إنتاج الذيفان السام لخلايا فيرو، وكانت نسبة انتشار الـVTEC O157:H7 %3.7 في لحوم الأبقار، و1.5% في لحوم الخنازير، و2.0% في لحوم الأغنام، و1.5% في لحوم الدجاج. وكانت هذه المرة الأولى التي يتم عزل الـ VTEC O157:H7 من أنواع مختلفة من اللحوم غير لحوم الأبقار. واستنتج الباحثون من دراستهم أن وجود الجرثومة ليس محصوراً بلحوم الأبقار وأن كافة أنواع اللحوم يمكن أن تكون ملوثة بالجرثومة وأنها تشكل بالتالي خطرا محتملاً للصحة العامة.

نتيجة تنامي الاعتقاد بالدور الكبير الذي يلعبه الذيفان السام لخلايا فيرو في إمْراضية الإِشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو O157:H7، وتأكيد بعض التقارير العلمية لوجود ترافق بين متلازمة انحلال الدم اليوريمية والتهاب القولون النزفي مع أنماط مصلية من الإِشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو غير النَمَط المَصْلِيّ O157:H7. قام بوب وزملاءه (**Bopp *et al.*, 1987**) بإجراء اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو لجميع ذراري الإِشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة من حالات الْتِهاب القَولون النَزْفِيّ طيلة ثلاث سنوات في مركز الوقاية والتحكم بالأمراض بولاية جورجيا في الولايات المتحدة الأمريكية. وبعدها قاموا بإجراء اختبارات التَّنْميط المَصْلِيّ *Serotyping*، التَنْميط الحَيَوِيّ، المقاومة للصادات الحيوية، شاكِلَة البلازميد *Plasmid Profile*، والالتصاق على خلايا هيلا HELA لجميع ذراري الإِشْريكيَّة القولونيَّة التي أنتجت كميات معتدلة أو عالية من الذِّيْفَان السام لخلايا فيرو. وصنفوا الذراري التي كانت إيجابية لإنتاج الذيفان السام لخلايا فيرو إلى ثلاث مجموعات، المجموعة الأولى ضمت 200 ذرية نموذجية Typical من الـ O157:H7. الثانية ضمت 12 ذرية من الإِشْريكيَّة القولونيَّة غير نموذجية Atypical للـ O157:H7، حيث كانت اثنتان منها مقاومة للصادات الحيوية، وواحدة سلبية للأندول، واثنتان ايجابيتان للسترات، وواحدة ايجابية لليوريا. و6 ذراري O157 غير متحركة. مع الإشارة لأن جميع الذراري السابقة كانت مشابهة للنوع النموذجي للـ O157:H7 من حيث شاكِلَة البلازميد، والتخمير السلبي أو البطيء للسوربيتول (بعد التحضين لمدة 72 ساعة على الدرجة 37 مْ). أما المجموعة الثالثة فضمت 11 ذرّية

من الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو ولكنها لا تنتمي للزُمْرَة المَصْلِيَّة O157، وتملك تنوعاً في شاكِلَة البلازميد، وكانت إيجابية للسوربيتول. اثنتان من هذه الذراري كانت من الأنماط المصلية المترافقة مع الإشْريكيَّة القولونيَّة الممرضة للأمعاء (O111:NM and O26:H11) بالرغم من كونها غير ملتصقة بخلايا هيلا. واستنتجوا في النهاية بأن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو، والمترافقة مع الْتِهاب القَولون النَزْفِيّ، تتضمن الأنواع غير النمطية من ذراري الـــ O157:H7 وأنماطاً مصلية أخرى. ولذا يجب على الباحثين والعاملين في مجال التقصّي والمسح، إعادة النظر في الطرق الحالية المتبعة في الكشف عن الـــ **VTEC**.

حدث وباء بالتهاب القولون النزفي الشديد في دار للعجزة بالمملكة المتحدة، حيث تطور الإسهال المدمّى عند 55 مقيم ، و18 موظف ، وتوفي 17 مقيم (أعمارهم بين الـــ 78-99). وفي التقصّي المخبري الرَّجعي Track Back عن الأوبئة السابقة قام **كريشنان وزملاءه** (**Krishnan *et al.*, 1987**) بأخذ العينات من 38 مريض، و37 موظف، و10 جثث. وقاموا بالتقصّي عن جميع المسببات المرضية المعوية المحتملة وبشكل خاص الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو O157:H7. حيث زرعوا العينات على وسط آغار ماكونكي بالسوربيتول. كما تم إخضاع الخلاصة البرازية لاختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو بحثاً عن وجود الذِّيْفَان السام لخلايا فيرو بشكل حرّ (**FVT** : Faecal Vero Toxin)، وتم تنميط جميع ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة واختبار مقدرتها على إنتاج الذيفانْ السّام لخلايا فيرو والبيتا غلُوكُورُونيداز Beta-Glucuronidase. ومن أصل 38 حالة التي ظهرت عليها الأعراض، 26 منها كانت إيجابية لاختبار الـــ **FVT**، واختبار الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو(Vero cell Assay)، أحدهما أو كليهما. ومن أصل الـــ 105 عينات المأخوذة من الـــ 38 مريض، كانت 30 عينة فقط إيجابية لكل من FVT وVTEC معاً، 13 عينة منها كانت إيجابية فقط لـــ FVT، 4 عينات كانت موجبة فقط لـــ VTEC، وكانت الـــ 27 عينة المأخوذة من الجثث سلبية لكل من الـــ FVT و VTEC. ولم يتم إيجاد أي مسببات مرضية أخرى في أي من الحالات. ومن أصل 19 ذرّية VTEC معزولة، 18 كانت تنتمي للنَمَط المَصْلِيّ O157:H7. ووجدوا بأن جميع

الذراري المعزولة من النَمَط المَصلِيّ O157:H7 كانت سلبية لإنتاج البيتا غلُوكُورُونيداز وحساسة للصادات الحيوية المستخدمة في علاج الإصابة بالإشْريكيَّة القولونيّة بشكل عام. ووجدوا بأن اختباري الــ VTEC والــ FVT، هما التقنيات الأكثر حساسية ونوعية في التشخيص المخبري للإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو المترافقة مع التهاب القولون النزفي. وأن كل من اختبارات السلبية للسوربيتول، والإيجابية للرافينوز، والسلبية للبيتا غلُوكُورُونيداز، تظهر كعلامات ثابتة ومساعدة لهما في التقصّي عن الــ O157:H7.

أجرى **والكر وزملاءه** (**Walker *et al*., 1988**) مسحاً لــ 1319 عينة برازية وذلك لفترة 3 أشهر، بحثاً عن الإشْريكيَّة القولونيّة O157:H7، المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو والغير مخمرة للسوربيتول. وتم عزل سبعة ذراري، أربع منها من مرضى مصابين بإسهال مدمّى، والثلاثة الباقية من مرضى مصابين بإسهال غير مدمّى. واستخلصوا من النتائج أن إجراء مسح لجميع العينات البرازية باستخدام كل من المصل الضدّي النوعي للــ O157 (التراصّ)، وخاصية عدم تخمير السوربيتول، مساعد تشخيصي لكل من الأطباء السريرين، والمخبريين والقائمين على الدراسات الوبائية. وأنهم استطاعوا بواسطتها الكشف عن حالات إيجابية، كانت ستهمل في حال عدم الاستعانة بها.

على ضوء الأوبئة العديدة التي حصلت بمتلازمة انحلال الدم اليوريمية والتهاب القولون النزفي والمترافقة مع الإشْريكيَّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو O157:H7 في كل من كندا والولايات المتحدة الأميركية في السنوات الماضية وما تمثله هذه الجرثومة من خطر حديث العهد يتهدد الصحة العامة وبنفس الوقت الذي ما تزال فيه الكثير من المعلومات الناقصة عن خصائص وأمراضية هذا النَمَط المَصلِيّ، قام راتنام وزملاءه (**Ratnam *et al*., 1988**) بدراسة مفصلة لتمييز خصائص 174 ذرّية من الإشْريكيَّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157:H7، والتي تمثل الذراري البشرية التي تم عزلها من الأوبئة والحالات العرضية Sporadic لالْتِهابُ القَولون النَزْفِيّ ، مُتَلازِمَةُ انْحِلالِ الدَّمِ-اليوريمية، ومن المرضى المصابين بالإسهال غير المدمّى وكذلك الحاملين للجرثومة بدون أعراض في كل من كندا والولايات المتحدة الأمريكية. ولاحظوا أن الــ VTEC O157:H7 تمتلك تفاعلات كيْميائيّة حَيَوِيّة متميزة، حيث أظهرت جميع الذراري المختبرة تفاعلاً سلبياً

100% لإنتاج أنزيم بيتا غلُوكُورُونيداز وكانت غير قادرة تخمير السوربيتول، وتفاعل إيجابي 100% لكل من سكر الرافينوز والدوليسيتول. فيما عدا ذلك كانت جميع الذراري مماثلة من حيث التفاعلات الكيْميائيّة الحَيَويّة لتلك التي تملكها الإشْريكيّة القولونيّة النموذجية. كما كانت معظم الذراري (97%) حساسة للصادات الحيوية الشائعة. جميعها تنتج مستويات قابلة للفحص من الذيفانْ السّام لخلايا فِيرو، وهنا تجدر الإشارة إلى أن 50% من الذراري أظهرت زيادة في مستوى الذِّيْفَان السام لخلايا فيرو عند تحضينها مع سلفات البوليميكسين -ب قبل اختبارها على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو. وأظهرت 70% من الذراري التصاقاً موضعياً ومنتشراً على خلايا HEP-2 وخَلَايا هِنْلي Henle 40 ، ولم يختلف نمط الالتصاق كثيراً عن ذلك الموجود عند بقية ذراري الإشْريكيّة القولونيّة.

تقصى إيروين وزملاءه (**Irwin *et al*., 1989**) عن الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو في دجاج اللحم بأونتاريو. حيث قاموا بأخذ عينات روث مباشرة من الأعور وتحضينها لمدة ليلة واحدة على مرق الصويا المغذية بالدرجة 37 مْ ثم اختبروا الرشاحة الجرثومية – بعد تحضيرها – على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو للكشف عن التأثير القاتل للذيفان السام لخلايا فيرو، وكانت جميع العينات سالبة.

إثر الأوبئة العديدة التي حصلت بالتهاب القولون النزفي في المقاطعات الكندية، والتي ترافقت مع استهلاك شطائر الهمبرغر من مطاعم الوجبات السريعة (كان يشار للمرض في الصحافة وقتئذ بـــ **مرض الهمبرغر Hamburger Disease**)، **أجرى مركز الوقاية والتحكم بالأمراض في كندا (Centers for Disease Control, 1990)** مسح وبائي للتقصي عن الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو VTEC في مطاعم الوجبات السريعة، حيث تمّ جمع العينات من اللحوم البقرية المفرومة خلال صيف كل من عام 1988 و 1989. وفي الوقت الذي أعطت فيه جميع العينات المختبرة خلال صيف 1988 نتائج سالبة، كانت نسبة انتشار الـــ VTEC 5% في العينات المجموعة خلال صيف عام 1989 (نسبة الـــ VTEC O157 2%، نسبة الـــ VTEC Non-O157 3%) (VTEC Non-O157 : ذراري الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فِيرو التي لا تنتمي للزُمْرَة المَصْليّة O157 والقادرة على التسبب بإمراض البشر). وكانت الذراري المنتجة للذيفانْ السّام

لخلايا فيرو VTEC Non-O157 تنتمي للأنماط المصلية التالية: O163:H19, O?:H19, O88:H49, O?:H12, O1:H20 .

تلبيةً للحاجة الملحة لتطوير تقانة مخبرية سريعة وسهلة الاستخدام وعالية الحساسية والنوعية بنفس الوقت، تُمكِّن المخابر التشخيصية من الكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو بأقل وقت وتكلفة ممكنة، عوضاً عن الطرق المتبعة التي تستهلك الكثير من الوقت والجهد بالإضافة للتكلفة المادية المرتفعة لها، وفي أول تجربة من نوعها، استغلَّ **بوللارد وزملاءه (Pollard *et al.*, 1990)** متوالية sequence الحَمْض النَّوَوِيّ Nucleic Acid الخاص بجين Gene كل من الذيفان السّام لخلايا فيرو-1 والذيفان السّام لخلايا فيرو-2 بصنع 4 أزواج من المَشْرَعات Primer بهدف إجراء اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل لمعرفة مدى حساسية ونوعية هذا الاختبار في الكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو، وذلك بالمقارنة مع اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو. حيث قاموا بإجراء الاختبار لـ 40 ذرية من الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو، و43 ذرية تنتمي لجراثيم مرضية معوية أخرى. وتم الكشف عن نواتج التضخيم Amplicon فقط لمَراصيف الحموض النووية منقوصة الأوكسجين *Template-DNA* المستخلصة من الذراري التي كانت إيجابية باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، حيث كانت جميع مَراصيف الحموض النووية منقوصة الأوكسجين *Template-DNA* الأخرى المستخلصة من ذراري الجراثيم السلبية الغرام سلبية لتفاعل البوليميراز المتسلسل، باستثناء خمسة مراصيف حموض نووية مستخلصة من ذراري الشِّيغيلّةُ الزُّحاريَّةُ-النَّمَط-1 والتي أعطت نتائج ايجابية بقوة للمَشْرَعات الخاصة بالذيفانْ السَّام لخلايا فيرو-1، وفسّروا ذلك بتنئ ر التنادد الشديد Homology بين متوالية الجين الخاص بذيفان الشيغا Shiga Toxin والذيفان السام لخلايا فيرو-1 (99%). كما ميزت المشرعات المستخدمة بوضوح بين الذيفانْ السَّام لخلايا فيرو-1 و-2 لذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو المختبرة. بنفس الوقت الذي أعطت فيه جميع ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة التي تنتمي لمجموعات مرضية أخرى نتائج سالبة لاختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل. ولمعرفة حساسية هذا الاختبار تمت مقارنة نتائجه مع نتائج

اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، حيث أعطت جميع الذراري التي كانت تملك تَعبيرا جينيا Gene Expression ضعيفاً عن الذيفان السام لخلايا فيرو VTs على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو (عيار ذيفان منخفض)، نتائج تضخيم إيجابية قوية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل. ولم تكن هناك أي علاقة بين عيار الذيفان السام لخلايا فيرو الذي تنتجه الجرثومة باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، وحساسية اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل في الكشف عن كل من الذيفان السام لخلايا فيرو-1 و -2. واستنتجوا في النهاية أن هذا الاختبار سيؤثر بشكل كبير على نتائج الدراسات الوبائية، نظراً لأنَّ معظم التقانات المخبرية المستعملة فيها عاجزة عن التقصي عن الـ Non-VTEC O157 لعدم امتلاك هذه الذراري لخصائص مميزة عن بقية ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة، بعكس الـ VTEC O157. حيث سيكون ممكناً التقصي عن عامل الضراوة الأهم الذي تملكه جميع ذراري هذه المجموعة وفي جميع أنواع العينات، في غضون ساعات قليلة وتكلفة مادية قليلة مقارنة مع اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو الذي يتطلب أياماً بالإضافة للتكلفة المادية المرتفعة له والجهد المخبري الكبير الذي يتطلبه.

صنَّف **مونتينيغرو وزملاءه (Montenegro *et al.*, 1990)** ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو بعد أن قاموا بعزلها من روث الأبقار السليمة. وتم عزل الجرثومة من 28 حيوان من أصل 259 حيوان مختبر (10.8%). وكَشف التشخيص التمييزي للذراري المعزولة، تبايناً واختلافاً، لكلٍ من النمَط المَصْلِيّ ونوع الذِّيْفَان. حيث كانت 15.8% من الذراري المعزولة تملك الـ VT1 فقط، 38.6% تملك الـ VT2 فقط، 45.6% تملك الاثنين معاً. وعند إجراء التنميط المصلي للذراري المعزولة تبين انتمائها لـ 19 نمط مصلي. وكانت 40% من الذراري المعزولة تنتمي لزمر مصلية مترافقة مع أمراض البشر (O22, O39, O82, O91, O113, O116, O126 وO136) في حين كانت هناك ذريتين فقط من النمَط المَصلِيّ O157:H7. وخرجوا بنتيجة أن الأبقار ربما تشكل مصدراً هاماً للإشْريكيَّةُ القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو المسببة لأمراض البشر.

قام **ريد وزملاءه (Read *et al.*, 1990)** بجمع 225 عينة من لحوم الأبقار، و235 عينة من لحوم الخنازير، و200 من لحوم الدجاج عشوائياً من المسالخ في جنوب غرب أونتاريو-

كندا. وتم أخذ السائل الطافي من وسط الإكثار واختبرت سمّيته على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو. وتم إجراء اختبار التعادل لجميع العينات التي أعطت نتائج إيجابية باختبار الزرع الخلوي باستخدام أضداد نوعية لكل من الذيفان السام لخلايا فيرو-1 والذيفان السام لخلايا فيرو-2، تم بعدها عزل الإشْريكيَّة القولونيَّة من العينات التي أعطت نتائج إيجابية، وتم تأكيد تصنيف الذراري باستخدام الاختبارات الكيْميائيّة الحَيَويّة والتنميط المصلي. وتم عزل الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو من 10.4% من لحوم الأبقار، و3.8% من لحوم الخنازير، في الوقت الذي أعطت فيه جميع العينات المأخوذة من لحوم الدجاج نتائج سالبة.

كان سوذينكول وزملاءه (**Suthienkul *et al.*, 1990**) هم أوّل من تقصّوا عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC في الحيوانات والمنتجات الغذائية في تايلاند. حيث قاموا بجمع عينات من روث ثلاث أنواع من الحيوانات (أبقار، دجاج، خنازير)، و6 أنواع من المنتجات الغذائية (ذبائح الأبقار بعد المعاملة في المسالخ، ولحوم بقرية مفرومة من متاجر اللحوم، لحوم دجاج من متاجر اللحوم، لحوم خنازير من متاجر اللحوم، فجل، ملفوف)، واختبارها لوجود الـــ VTEC. وكانت نسبة انتشار الـــ VTEC في العينات كالتالي: 84% في روث الأبقار، 8% في ذبائح الأبقار، 9% في اللحوم البقرية المفرومة، 1% في لحوم الدجاج، 1% في لحوم الخنازير، في حين أعطت جميع العينات التي تم جمعها من روث الدجاج وروث الخنازير والخضروات نتيجة سالبة لوجود الـــ VTEC. وتم عزل 119 ذرية من الـــ VTEC في هذه الدراسة بيَّن التقصّي عن الجينات المشفرة لكل من الذيفان السام لخلايا فيرو-1 والذيفان السام لخلايا فيرو-2 فيها أنَّ: 24% منها يملك الـــ *vt1*، 31% يملك الـــ *vt2*، 45% يملك الاثنين معاً (*vt1&vt2*). وعند إجراء اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو وخلايا هيلا كانت جميع الذراري إيجابية باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، ولكن 76% منها فقط أعطى نتيجة إيجابية على المنبت أحادي الطبقة لخلايا هيلا. وعند إجراء اختبار التراصّ لمعرفة ما إذا كانت هذه الذراري تنتمي للأنماط المصلية التالية (,O26 , O111 , O145 , O157 O25)، أعطت جميع الذراري نتيجة سالبة. واستخلصوا من نتائج البحث أن الأبقار تشكل أهمّ

ثوي خازن للإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في تايلاند، وأنها تشكّل خطراً يهدد الصحة العامة فيها ما يستدعي رفع درجة الإجراءات الصحية المتبعة في المسالخ لمنع حدوث التلوث اللحوم بالروث، وفي متاجر اللحوم لمنع حدوث التلوّث التصالبي بين أنواع اللحوم المختلفة.

في وصفٍ لبنية وآلية عَمل الذيفانات السّامة لخلايا فيرو التي تنتجها الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو أشار **بييرارد وزملاءه** (**Pie´Rard *et al.*, 1991**) إلى أنّ جميع الذيفانات السامة لخلايا فيرو VTs التي تنتجها الإشْريكيّة القولونيّة تشترك في البنية العامة لها والمرتكزة على الهيكلية الوحدوية A-B، حيث يتألّف الشكل النموذجي للذيفان من وحدة فرعية A (A-subunit) واحدة وزنها الجزيئي 32 كيلو دالتون والتي تتألف بدورها من بِبْتيدين هما A1 الذي يبلغ وزنه الجزيئي 28 دالتون وA2 الذي يبلغ وزنه الجزيئي 4 كيلو دالتون وترتبط هذه الببتيدات برابطة كبريتية ثنائية مع بعضها. وتتضمن A1 الفعالية الأنزيمية، في حين تقوم الـ A2 بربط الوحدة الفرعية A إلى المكون الخماسي للوحدة الفرعية B (***B-subunit***) والتي يزن كل منها 7.7 كيلو دالتون. ويربط المكوّن الخماسي للوحدة الفرعية B الذّيفان بمستقبلات شحمية سكرية (غلوبو تري أسيل سيراميد) *Globotriaosylceramide* أو GB3 الموجود على سطح الخلايا حقيقية النوى. وفي حين أن الـ GB3 هو المستقبل الرئيسي لمعظم الذيفانات السامة لخلايا فيرو، فإنّ المتغاير VT2e يستخدم الـ GB4 كمستقبل له. ويترافق هذا المتغاير بشكل عام مع مرض الوذمة في الخنازير أكثر من ترافقه مع أمراض البشر. وبعد ارتباط الذّيفان ككل بالخلية الهدف، يتم التقامه وينقل إلى جهاز غولجي وبعده إلى الشبكة الهيولية البطانية، ثمّ تعاد الوحدة الفرعية A إلى الهيولى، حيث تتموضع على الوحدة S60 للريبوزم. ويتصرف الببتيد A1 بشكل نوعي كأنزيم الـ N-GLYCOSIDASE الذي يقوم بإزالة الأدنين من الرنا الريباسي Ribosomal RNA لريبوزومات الخلايا حقيقيّةُ النّواة *Eukaryotic Cell*، وبالتالي تثبيط تركيب البروتين. إن عرقلة تركيب البروتين تقود في النهاية إلى موت الخلايا الظهارية المبطنة في الكلية، أو الخلايا الظهارية المعوية، أو خلايا فيرو وهيلا، أو أي خلية تحوي مستقبلات GB3 (أو GB4 فيما يتعلق بـ VT2e).

ذكر **غريفين وتاويكس (Griffin And Tauxe, 1991)** وجود أكثر من 200 نَمَط مَصلِيّ (O:H) يترافق مع الإشْريكِيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو، وأنه ضمن معظم هذه الأنماط المصلية هناك ذراري منتجة وغير منتجة للذيفانات السامة لخلايا فيرو (أي أنه ضمن النَمَط المَصلِيّ الواحد هناك ذراري إيجابية وسالبة لإنتاج الذيفان وينطبق ذلك على الزمرة المصلية O157). وأنَّ أكثر من 50 نَمَط مَصلِيّ بين هذه الـــ 200 تترافق مع كل من التهاب القولون النزفي ومُتَلاَزِمَة انْحِلاَلِ الدَّمِ-اليوريمية، وأشارا في دراسة وبائية نظرية قاموا بها إلى أن أكثر الأنماط المصلية شيوعاً للإشْريكِيَّةُ القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو VTEC Non-O157 التي تترافق مع هذه الأمراض هي : O26:H11، O103:H2، O111:NM، O113:H21. وحدثت 10 أوبئة على الأقل نتيجة هذه الأنماط في كل من اليابان، ألمانيا، ايطاليا، أستراليا، جمهورية التشيك والولايات المتحدة الأمريكية. ونتجت 20-25% من حالات مُتَلاَزِمَةُ انْحِلاَلِ الدَّمِ-اليوريمية التي حدثت في أمريكا الشمالية عن الإصابة بالإشْريكِيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC Non-O157:H7.

حصل وبائين بمتلازمة انحلال الدم اليوريمية في الولايات المتحدة الأمريكية، الأوّل في ولاية وسكنسون، ترافق مع استهلاك الحليب البقري الخام في عام 1986. والثاني في العاصمة واشنطن، ترافقَ مع تناول الهمبرغر في عام 1990، وتم عزل الإشْريكِيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو من النَمَط المَصلِيّ O157:H7 من المرضى في كلا الوبائين. وفي التقصي الرجعي **Track Back** لمعرفة مصدر هذه الأوبئة قام **ويلس وزملاءه (Wells *et al.*, 1991)** بجمع عينات روث من مزارع الأبقار في كلا الولايتين، كما قاموا بجمع عينات حليب من مزارع الأبقار في وسكنسون وعينات همبرغر من مطاعم الوجبات السريعة في واشنطن، واختبارها لوجود الإشْريكِيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157:H7 كما قاموا بالتقصي عن الـــ VTEC Non-O157 في عينات الروث. وذلك باستخدام الطرق التقليدية للزرع والتصنيف الجرثومي، واختبارات التراص والتعادل ، واختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو. وكانت نسبة الانتشار في عينات الروث: 45%، 80% لكل من الـــ VTEC O157:H7 والـــ VTEC Non-O157 على التوالي. في حين كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157:H7: 66.6%،

4.4% في عينات الهمبرغر والحليب على التوالي. وعند مقارنة ذراري الـ VTEC O157:H7 مع تلك المعزولة من الأوبئة تبين تطابق ذرية واحدة معزولة من أحدى مزارع الأبقار مع تلك التي سببت الوباء في وسكنسون ، في حين لم تطابق أي من الذراري تلك التي تسببت بالوباء في واشنطن بالرغم من نسبة الانتشار المرتفعة للجرثومة في عينات الهمبرغر. وعند إجراء التنميط المصلي لذراري الـ VTEC Non-O157 تبين أنها تنتمي لـ 28 نمط مصلي. وأشارت النتائج أن 5.8% من ذراري الـ O157:H7 تنتج الذيفان السام لخلايا فيرو-1 ، 53% تنتج الذيفان السام لخلايا فيرو-2 ، 41.2% تنتج الذيفانين معاً (VT1, VT2). في حين كانت معظم ذراري الـ VTEC Non-O157 تُفرز أحد الذيفانين فقط .

اختبر **كارخ وزملاءه (Karch *et al*., 1992)** مدى ثباتية واستقرار الجينات المشفرة للذيفانات السامة لخلايا فيرو في 45 ذرّية من الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو، أعطت نتائج إيجابية لوجود الذيفانات في العزل الأولي، وقد لاحظوا أنه بعد تمرير الذراري على مرق الصويا المغذية وبقية الأوساط الشائعة المستخدمة في المخابر، أنّ 15 من أصل الـ 45 ذرّية فقدت إما الجين المشفر للذيفانْ السّام لخلايا فيرو-1 (*vt1*) أو الجين المشفر للذيفانْ السّام لخلايا فيرو-2 (*vt2*) أو كليهما. واستنتجوا أن فقدان الجينات يختلف حسب الذرّية، حيث تبدي الذراري التي تنتمي للأنماط المصلية O2:H5 و O73:H34 ميلاً لفقدان الجينات المشفرة للذيفانات السامة لخلايا فيرو. في حين يظهر النَمَط المَصْليّ O26:H11 استقراراً شديداً.

كان زادك وزملاءه (Zadic *et al*., 1993) هم من أثبتوا أنّ إضافة السيفكسيم Cefixime بنسبة 0.5 مغ/ل وتيلُوريت البُوتاسيُوم Potassium Tellurite بنسبة 2.5 مغ/ ل تجعل من وسط آغارْ ماكُونكي بالسوربيتول (CT-SMAC) وسطاً انتقائياً للـ O157:H7، حيث أنها تسمح بنمو ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157:H7 وتملك تأثيراً مثبطاً كبيراً لنمو معظم ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة Non-O157 والجراثيم الأخرى غير المخمرة للسوربيتول التي تنتمي للمجموعات الأخرى مثل، الجراثيم الغازية Aeromonas، القَوْزَبيَّة Plesiomonas (جراثيم من فصيلة الضمّيات)، المُورْغانِيلّة

Morganella (جِنسُ جَراثيم مِنْ فَصيلَةِ الأمْعائيَّات). ونصحوا باستعماله كإجراء روتيني مسحي في جميع المخابر التشخيصية.

في كانون الثاني من 1993، حدث وباء بالْتِهابُ القَولون النّزفِيّ ترافق باستهلاك شطائر الهمبرغر غير المطهوة بشكل جيد، في سياتل بواشنطن-الولايات المتحدة الأمريكية. وتطورت عند بعض الأفراد أعراض مُتَلاَزِمَةُ انْحِلاَلِ الدَّمِ-اليوريمية وأبلغ مركز الوقاية والتحكم للأمراض (**Centers for Disease Control, 1993**) عن ترافق 477 حالة مع الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو O157:H7 وذلك بعد أن تمّ تشخيصها مخبرياً. وقام **مركز الوقاية والتحكم بالأمراض** لاحقاً في تلك السنة بالتأكيد على ضرورة قيام المخابر السريرية والتشخيصية التابعة له بزرع روتيني لجميع عينات البراز الواردة إليها والمأخوذة من أشخاص مصابين إما بالإسهال المدمّى أو بمُتَلاَزِمَةُ انْحِلاَلِ الدَّمِ-اليوريمية، على وسط آغارُ ماكُونكي بالسوربيتول وذلك للتقصّي عن الـ VTEC O157:H7 كمسبب أساسي مشتبه لهذه الحالات. كما أصدر قراراً يفرض فيه على السلطات الرقابية المختصة، إتلاف أي وجبة لحوم بقرية مفرومة يثبت وجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157:H7 بأي نسبة كانت.

وعند مقارنة ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157:H7 المعزولة من الوباء السابق، مع تلك المعزولة من أول وباء مسجل للإشْريكيَّةُ القولونيَّة المنتجة للذيفان السَّام لخلايا فيروO157:H7 عام 1982 والذي كانت شطائر الهمبرغر هي السبب في حدوثه أيضا، تبين تطابق الذراري من حيث: إفراز الذيفانات السامة لخلايا فيرو، ميزات الالتصاق وشاكلة البلازميدة، وإنتاج الحالّة الدّمَويَّة المعوية Enterohaemolysin (**O`brien *et al.*, 1993**).

تقصّى بيوتين وزملاءه (**Beutin *et al.*, 1993**) عن وجود الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC في الحيوانات السليمة في ألمانيا، حيث قاموا بجمع عينات روث من 7 أنواع مختلفة من الحيوانات (أبقار، أغنام، ماعز، دجاج، خنازير، كلاب، قطط) واختبارها لوجود الـــ VTEC. وتم عزل الـــ VTEC من 208 حيوان من أصل 720

حيوان مختبر (28.9%). وباستثناء الدجاج، كانت جميع أنواع الحيوانات المختبرة إيجابية لوجود الـــ VTEC. حيث كانت أكبر نسبة لانتشار الـــ VTEC موجودة في الأغنام 66.6% (VTEC *vt1*: 21.3%, VTEC *vt2*: 26.5%, VTEC *vt1&vt2*: 52.2%)، تليها الماعز 56.1%، ثم الأبقار 21.1% (VTEC *vt1*: 21.2%, VTEC *vt2*: 27.3%, VTEC *vt1&vt2*: 51.5%). وعند إجراء التنميط المصلي للـــ 208 ذرية المعزولة في هذه الدراسة تَبيَّن أنها تنتمي لـــ 41 نمط مصلي، وبنفس الوقت الذي ضمّتْ فيه 5 أنماط مصلية (OX3:H8 , O128:H2, O146:H21, O91:H-, O5:H-) 54.8% من هذه الذراري، لم يتم تصنيف أيّ من الذراري المعزولة على أنها من الأنماط المصلية التالية (O157:H7, O26:H11, O111:H-) والتي ركّزت عليها معظم الأبحاث السابقة نتيجةَ ترافقها مع أمراض البشر. واستنتجوا أنّ جميع الحيوانات يمكن أن تلعب دور الثوي الخازن للأنماط المرضية من الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو.

إثرَ فشلِ الدراسات الوبائية في معرفة سبب العديد من الحالات المتفرقة Sporadic لالتهاب القولون النزفي HC ومتلازمة انحلال الدم اليوريمية HUS، أجرى **سامادبور وزملاءه** (**Samadpour *et al.*, 1994**) دراسة تقصّوا فيها عن الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو **VTEC** في منتجات اللحوم في الأماكن المخصصة لبيعها في سياتل بالولايات المتحدة الأمريكية وذلك بهدف معرفة مصدر الأوبئة التي حصلت بالأمراض السابقة. وكانت النتائج مفاجئة، ففي حين لم يتم عزل الـــ VTEC O157:H7، وجدوا أن هناك انتشاراً عالياً للإشْريكيّةُ القولونيّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو Non-O157 VTEC في العينات المفحوصة، حيث كانت نسبتها في لحوم الأبقار 23% (*vt1*: 3%, *vt2*: 12%, *vt1&vt2*: 8%)، وفي لحوم الخنازير 18%، وفي لحوم الأغنام 48% (*vt2*: 24% , *vt1&vt2*: 24%)، وفي لحوم العجول البيضاء Veal 63%، وفي لحوم الدجاج 12% (*vt2*: 12%)، وفي لحوم الحبش 7%، وفي لحوم الأسماك 10% وفي المحار 5%. وعزوا وجود الـــ VTEC في كل من الأسماك والمنتجات البحرية الأخرى ولحوم الدواجن، إلى حدوث تلوث تصالبي بالأغذية الأخرى، والذي يرجح أنه حدث ضمن

المتاجر المخصصة لبيعها. وأظهر التنميط المصلي للذراري المعزولة انتمائها لـ 12 زمرة مصلية مختلفة، جميعها معزولة سابقاً من حالات مرضية بشرية.

سُجّل أكبر وباء بمتلازمة انحلال الدم اليوريمية المترافقة مع الإِشْرِيكيّة القولونيّة المفرزة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو في أميركا الشمالية وذلك حتى عام 1993. وتسبب به تناول الهمبرغر من سلسلة مطاعم وجبات سريعة في عدة ولايات، حيث تم تسجيل إصابة 732 شخصاً في كل من واشنطن وايداهو ونيفادا، وكاليفورنيا، وتم نقل 195 حالة منهم إلى المشافي وتوفّي 4 أشخاص بينهم. وقد حدث تلوث الهمبرغر في هذا الوباء نتيجة إدخال تقانة جديدة في تصنيع اللحوم ومعاملتها، حيث تتضمن هذه التقانة فرم اللحوم المأخوذة من آلاف الأبقار المأخوذة من عدة مزارع معاً، ضمن آلة كبيرة مخصصة لفرم اللحوم لإنتاج أقراص الهمبرغر، وفي المرحلة اللاحقة تتضمن التقانة تجميد الأقراص وتوزيعها على الآلاف من المطاعم في عدة ولايات (**Bell *et al.*, 1994**).

ذكر فارمر (**Farmaer, 1995**) أنّه لا توجد خصائص كِيْميائيّة حَيَويّة تميز أغلبية الأنماط المصلية للإِشْرِيكيّة القولونيّة النَزْفية المِعَويّة EHEC، ولكن هناك بعض الخصائص التي تميز الـ O157:H7 والتي تم استغلالها في عزل وتصنيف هذا النَمَط المَصْليّ. ومن أهمها التخمير البطيء جداً للـ د-سوربيتول، حيث أنّ 75-94% من ذراري الإِشْرِيكيّة القولونيّة تكون مخمرة للسوربيتول. كما أن ذراري الـ O157:H7 لا تخمر الرهمانوز، في حين أنّ 60% من الذراري غير المخمرة للسوربيتول والتي تنتمي لبقية الزُمَرَ المَصْليّة تُخمر الرهمانوز. ومن الخصائص الكِيْميائيّة الحَيَويّة الأخرى التي تميز الـ O157:H7 عن بقية الأنماط المصلية عدم مقدرتها على إنتاج أنزيم بيتا غلُوكُورُونيداز. كما أن الـ O157:H7 لا تنمو بشكل جيد بدرجة حرارة 44-45 مْ والتي تستعمل عادة لتنمية الإِشْرِيكيّة القولونيّة المأخوذة من عينات الماء والغذاء.

وجد أوجيدا وزملاءه (**Ojeda *et al.*, 1995**) في بحث قاموا به أن 19 ذريّة من الإِشْرِيكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو تم عزلها من مرضى مصابين بمُتَلاَزِمَةُ

انْحِلاَلِ الدَّمِ-اليوريمية في التشيلي كانت سلبية لتخمير السوربيتول بما فيها الذراري التي تنتمي للأنماط المصلية O26 و O111 والـ O55.

وفي استقراءٍ لبويس وزملاءه (**Boyce *et al.*, 1995**) أشاروا إلى أنَّ تقديرات مركز الوقاية والتحكم بالأمراض للمحصلة السنوية لإصابات الإِشْرِيكِيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو والتي تبلغ 20000 إصابة سنوياً مع حدوث 250 حالة وفاة بينها، غير دقيقة تماماً. وذلك بسبب فشل العديد من المخابر السريرية وعدم مقدرتها على التقصّي عن الإِشْرِيكِيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو باستثناء النَمَط المَصْلِيّ VTEC O157:H7، مما يؤدي لحسابات خاطئة وغير دقيقة في عدد الإصابات السنوية التي تسببها. في حين أنها تحتل في بعض الدول والمناطق المرتبة الثانية أو الثالثة من حيث أكثر الجراثيم المعزولة مخبرياً من حالات التسمم الغذائي. وذكروا أنه تمَّ في الولايات المتحدة تسجيل الإِشْرِيكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو على أنها المسبب الأكثر شيوعاً في حالات الإسهال المدمّى، مع الأخذ بعين الاعتبار أن النَمَط المَصْلِيّ O157:H7 يشكل 80% من حالات الإصابة بهذه المجموعة، وأنَّ الذراري التي تنتمي للأنماط المصلية الأخرى VTEC Non-O157 لا يتم الكشف عنها روتينياً في المخابر نتيجة عدم امتلاكها للتقانات اللازمة لذلك أولاً وعدم امتلاك معظم ذراري هذه الأنماط المصلية لخصائص مميزة ثانياً، وبالتالي فإن المحصلة الكلية لإصابات هذه المجموعة ستكون غير دقيقة ومن الصعب الثقة بالأرقام الحالية لها.

أشار بينيامين وداتا (**Benjamin & data, 1995**) إلى أن انخفاض مستوى الجرعة الخامجة الدنيا للإِشْرِيكِيَّةُ القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو (أقل من 100 جرثومة/غ) مقارنة مع بقية المجموعات الممرضة للإِشْرِيكِيَّةُ القولونيَّة (**EPEC** $> 10^5$) (**ETEC** $> 10^8$) (**EIEC** $> 10^8$)، بالإضافة لتحملها درجات الباهاء المنخفضة ($pH > 2.5$) لأكثر من ساعتين، هما المفتاحان الأساسيان اللذان يمكنا الجرثومة من التسبب بالأمراض المنقولة بالغذاء Food-Born-Disease. وأن أهم الطرق للتحكم فيها في الغذاء هو الحرارة. حيث أنها حساسة بشكل غير طبيعي للحرارة مقارنة مع بقية الأمْعائِيَّات.

وأشاروا إلى أن تطبيق درجة حرارة 70ْ لمدة 2 دقيقة ستكون فعالة في قتل الأعداد الكبيرة منها (10^6 cell/g).

نوّه **جوهانسون وزملاءه (Johanson *et al.*, 1996)** إلى تزايد عدد الأوبئة المسجلة بالإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيروVTEC Non-O157 ، وإلى ارتفاع ملحوظ في نسبة حدوث الأمراض التي تترافق معها، وشددوا على ضرورة الكشف عن الذيفانات السامة لخلايا فيرو (VTs) والجينات المشفرة لها (vt_s) في الدراسات الوبائية، للوصول إلى تقدير حقيقي ومعنوي لنسبة حدوث الأمراض الناتجة عن هذه الأنماط، نظراً لأنَّ معظم هذه الأنماط المصلية لهذه المجموعة مخمرة للسوربيتول ولا توجد أوساط خاصة بها مثل وسط آغارُ ماكُونكِي بالسوربيتول المخصص للنمط المصلي VTEC O157:H7، وبالتالي فإن الطريقة الوحيدة التي تصبح متاحة هي استخدام المنابت المستخدمة عامة لعزل الإشْريكيَّة القولونيَّة وإجراء الاختبارات الكيْميائيّة الحَيَويّة بعدها، وتطبيق تقانات البيولوجيا الجزيئية التي تكشف عن الجينات المُشفّرة لعوامل الفوعة مثل الـــ *vt1, vt2*.

أشار **كالديروود وزملاءه (Calderwood *et al.*, 1996)** إلى أنَّ الشكلان النمطيان للذيفانْ السّام لخلايا فيرو-1 و- 2 يتطابقان بـــ 55% و 57% من حيث الوحدة A و B على التوالي. وأن الجين المشفر للذيفانْ السّام لخلايا فيرو-1 منطقة عالية الحفظ Highly Conserved Area، ويمتاز بذلك عن الجين المشفر للذيفانْ السّام لخلايا فيرو-2. ولهذا فإن الطفرات والمتغايرات variants التي تلاحظ على الذيفانْ السّام لخلايا فيرو-2 أكثر بكثير من تلك التي تلاحظ على الذيفانْ السّام لخلايا فيرو-1.

أجرى **ران وزملاءه (Rahn *et al.*, 1996)** مقارنة بين الاختبار المباشر لكل من الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو (VCA: Vero Cell Assay) وتفاعل البوليميراز المتسلسل كمؤشران Indicator في التقصّي عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو، وكاختبارات مُنبِئة Predictor مساعدة في عزلها من عينات البراز عند كل من الأبقار والإنسان. ووجدوا أن هناك ترابط ايجابي هام بين نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل وبين عزل الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو من العينات البقرية الإيجابية

لاختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو. بالإضافة لوجود ترابط إيجابي طردي بين عيار الذِّيْفَان السام لخلايا فيرو في اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو وبين احتمال Probability عزل الـــ VTEC من العينة. ولاحظوا أن هناك توافق بين اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو وتفاعل البوليميراز المتسلسل في كل من العينات البشرية والبقرية. وكانت حساسية ونوعية اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل بالمقارنة مع اختبار الزرع الخلوي في عينات الأبقار، 82.0% و 86.5% على التوالي. في حين كانت الحساسية والنوعية للاختبار 59.3%، 98.1% على التوالي في العينات البشرية. واستنتجوا أنه على الرغم من كون العلاقة بين نتائج الاختبارين ليست مطلقة، فإنهما يتممان بعضهما عند استخدامهما معاً للتنبؤ والمساعدة في عزل الـــ VTEC.

قام **مركز الوقاية والتحكم بالأمراض** (**Centers for Disease Control, 1997**) في الولايات المتحدة الأميركية بتأسيس شبكة لترصد الأمراض المنقولة عن طريق الغذاء-Food Net وذلك على الإنترنت، وذلك بهدف تقييم خطر الأمراض المنقولة عن طريق الغذاء في العديد من نقاط الترصد لهذه الأمراض في الولايات المتحدة الأمريكية. واحتلت الإِشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو O157:H7 المرتبة الرابعة من حيث تكرار الإصابات وذلك في العام الأول لبدء البرنامج 1996. حيث تشير هذه النتائج إلى كون الإِشْريكيَّة القولونيَّة O157:H7 هي رابع أكبر مسبب للأمراض المنقولة عن طريق الغذاء في الولايات المتحدة الأمريكية.

ذكر **كيزكيماكي وزملاءه** (**Keskimaki *et al.*, 1997**) وجود العديد من ذراري الإِشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو التي لا تملك الجين المشفر للآفات الطامسة والماحية (*eae*) وغير قادرة على التعبير عن بروتين الأنتيمين Intimin، ومترافقة بنفس الوقت مع حالات شديدة بكل من متلازمة انحلال الدم اليوريمية والتهاب القولون النزفي في الإنسان. وأكدوا أن امتلاك ذراري الـــ VTEC للآفات الطامسة والماحية ليس شرطاً ضرورياً لترافقها مع أمراض البشر، وأن عامل الضراوة الأساس الذي تملكه جميع ذراري الإِشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو المترافقة مع أمراض البشر هو الذيفانات السامة لخلايا فيرو.

وفي دراسة لعوامل الخطر Risk Factor التي تؤدي لحدوث الإصابات العرضية والفردية بالإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فِيرو أكد ميد وزملاؤه (**Mead *et al.*, 1997**) أن الاستهلاك المنزلي للحوم الأبقار يعتبر أهم عامل خطر في الإصابات الفردية بالـــ O157:H7 في كندا والولايات المتحدة الأمريكية، وأظهرت الدراسة التي قاموا بها أن الهمبرغر المعد منزلياً يعد من المصادر الهامة للإصابات العرضية، وأشاروا إلى أن الإصابة يمكن أن لا تحدث من التناول المباشر للحوم غير المطهية بشكل جيد فقط، وإنما من التلوث التصالبي للمواد الغذائية المرافقة أثناء إعداد الطعام ومعاملة اللحوم.

اقترح دورسا وزملاءه (**Dorsa *et al.*, 1997**) تطبيق بخّاخات البخار أو الماء الساخن لغسل الذبائح أو تعريضها للأحماض العضوية وذلك في المسالخ التجارية وذلك كنوع من الإجراءات التطهيرية الفعَّالة في التخلص من التلوث الزائد بالـــ O157:H7 بالرغم من أنها لا تمنعها تماما كما أنها رخيصة نسبياً ولا تؤثر عليها كمنتجات غذائية، وأشاروا إلى أن أهم المحاليل المستخدمة. حمض الخل، حمض اللبن، وفوسفات الصوديوم الثلاثية.

تقصَّى بيررارد وزملاءه (**Pie´Rard *et al.*, 1997**) عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC في منتجات اللحوم في بلجيكا، حيث جمعوا 2440 عينة لحوم (أبقار، أغنام، دجاج، حبش، أرانب، خنازير، خيول، غزلان) من مطاعم الوجبات السريعة وأماكن بيع اللحوم، وقاموا في البداية بإجراء خطوات الزرع والتصنيف الجرثومي لجميع العينات، تم بعدها الكشف عن الجينات المشفرة لكل من الذيفان السام لخلايا فيرو-1 و-2 (*vt1,vt2*) لذراري الإشْريكيَّة القولونيّة المعزولة وذلك باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد، وتمّ إخضاع جميع الذراري التي أعطت نتائج إيجابية بالاختبار السابق لاختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، ولاحظوا أن هناك بعض الذراري التي كانت إيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل وسالبة باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، وأشاروا أن ذلك قد يعود لعدم وجود تعبير جيني للذيفان في هذه الذراري أو فقدان الجينات المشفرة للذيفانات في هذه الذراري أثناء تمريرها. وكانت نسبة انتشار الجرثومة بالاعتماد على نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد: 1.8% في لحوم الأبقار، 4% في لحوم الأغنام، في حين أعطت جميع عينات اللحوم المتبقية نتيجة سالبة

لوجود الجرثومة. وعند إجراء التنميط المصلي للذراري المعزولة تبين أنها تنتمي لـــ 44 نمط مصلي. ولم تكن أي من هذه الذراري تنتمي للنمط المصلي O157.

في دراسة نظرية وبائية قام بها ميشينوا وزملاءه (**Michino *et al.*, 1998**) أشاروا أن عدد الإصابات بالإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فِيرو التي حدثت في اليابان بين أيار وكانون الأول من عام 1996 في عدة أوبئة بلغت 11826 حالة، مع تسجيل وفاة 12 منهم نتيجة الإصابة بمُتَلاَزِمَةُ انْحِلاَلِ الدَّمِ-اليوريمية، وبرهنت التحقيقات الوبائية والمخبرية التي أجريت أن السبب في معظمها عائد إلى تلوث مصادر الأغذية التي يتم تقديمها في المدارس الابتدائية والمراكز الصحية الخاصة بالأطفال ودور العجزة والمصانع، وبالمقابل سجل انخفاض كبير في عدد الإصابات بالجرثومة في السنة التي تلتها مباشرة حيث لم يتم تسجيل أي أوبئة كبيرة بين كانون الثاني وآذار من عام 1997، وعزوا ذلك للإجراءات الصارمة التي فرضت لرفع مستوى العقامة والرقابة الصحية على مصادر الأغذية في تلك السنة.

تقصّى هيوفلينك وزملاءه (**Heuvenlink *et al.*, 1998**) خلال الفترة الواقعة بين تموز وتشرين الثاني من عامي 1995 و1996 عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فِيرو VTEC O157 في الأبقار والأغنام في هولندا، حيث قاموا بجمع عينات من روث الحيوانات المعدة للذبح في المسالخ الرئيسية بهولندا، وتم الكشف فيها عن وجود الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فِيرو VTEC O157. وكانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157: 6.3%، 4% في الأبقار والأغنام على التوالي. وباستثناء ذريتين معزولتين من الأبقار كانتا سالبتين لوجود الجينات المشفرة للذيفانات السامة لخلايا فيرو-1 و-2، كانت جميع الذراري المعزولة إيجابية لامتلاكها الجينات المشفرة للذيفانات السامة لخلايا فيرو (الذيفانْ السَّام لخلايا فِيرو 1 مع/أو الذيفانْ السَّام لخلايا فِيرو2) والآفات الطامسة والماحية. لذا فإنها تعتبر مسببات مرضية محتملة للبشر. واستنتجوا أن الأبقار والأغنام تشكل أهم الأثوياء الخازنة لذراري VTEC O157 المترافقة مع أمراض البشر في هولندا .

برهن فوكوشيما وزملاءه (Fukushima *et al.*, 1999) مقدرة الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو من الزمر المصلية O26، O157, O111 على البقاء في روث الأبقار لمدة طويلة، وأكدوا على ضرورة المعاملة الملائمة للروث بغية التخلص من هذا التهديد المحتمل لصحة البشر.

تمكن فاجان وزملاءه (Fagan *et al.*, 1999) من تطوير اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد *Multiplex*-PCR للكشف السريع عن الجينات المشفرة لكل من الذيفان السام لخلايا فيرو-1 و-2، الأنتيمين (*eaeA*)، والحالّة الدَمَويَّة المِعَوِيّة (*hlyA*) وقاموا بتجربة هذه الطريقة للكشف عن هذه الجينات في 444 عينة أخذت من روث الأبقار والأغنام والماعز والخنازير. وكانت الحدود الدنيا القابلة للتقصي عن الجرثومة، بين 18 و37 نسخة من الجينوم البكتيري كحد أدنى. وكانت أكثر الجينات مصادفة هي تلك التي تشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 والحالّة الدَمَويَّة المِعَوِيّة.

قارن كورنيك وزملاءه (Cornick *et al.*, 2000) بين الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو VTEC O157 مع بقية المجموعات المرضية للإشْريكيَّةُ القولونيَّة في الأغنام وذلك من ناحية، المِقْدَار *Magnitude*، المُدَّة *Duration*، السِرايَة *Transmissibility*. حيث تم تطعيم أغنام فتية بمزيج مكون من ذريتين للإشْريكيَّةُ القولونيَّة VTEC O157:H7، وذريتين من الإشْريكيَّة القولونيَّة المُنْتِجة للذِّيفانِ المِعَوِيّ *EnteroToxigenic E.Coli* (**ETEC**)، وذرّية واحدة من الإشْريكيَّة القولونيَّة الممرضة للأمعاء *EnteroPathogenic* ***E. coli*** (**EPEC**). ولم يجدوا فرقاً معنوياً في النتائج بين المجموعات المرضية من حيث المقدار، السِرايَة. ولكن ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو VTEC O157 بقيت بعد التطعيم لفترة أطول (بين الأسبوعين والشهرين) من بقية المجموعات المرضية. مما يدعم النظرية التي تقول بأن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو VTEC O157 أكثر مقدرة على البقاء والاستمرار في السبيل المعوي للأغنام من بقية المجموعات المرضية للإشريكية القولونية في الأغنام.

تمكن فورست وزملاءه (Furst *et al.*, 2000) من عزل ثلاث ذراري من الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو من مرضى مصابين بالإسهال المدمّى، وأثبتوا امتلاك كلٍ من هذه الذراري لثلاثة جينات مشفرة للذيفانات السامة لخلايا فيرو (*vt1*, *vt2*, *vt2c*). وكانت الذراري من الأنماط المصلية -O52:H19, O75:H-, O157:H. واستنتجوا أن وجود ثلاثة أنماط جينية من الذّيِفَان السام لخلايا فيرو معاً، يعزز من ضراوة ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو، ويجب التقصّي عنها. كما أثبتت النتائج مقدرة الجينات المشفرة للذيفانات السامة لخلايا فيرو على التواجد ضمن النَمَط المَصلِيّ الواحد. بالإضافة لمقدرتها على الانتشار بين عدة أنماط مصلية.

قام بيلازيوسكا وزملاءه (Bielaszewska *et al.*, 2000) بعزل ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو من النَمَط المَصلِيّ -O157:H المخمّرة للسوربيتول، من مريضين واحد مصاب بمُتَلاَزِمَةُ انْحِلاَلِ الدَّمِ-اليوريمية، والآخر بإسهال مدمّى، ومن أبقار حلوب مرتبطة وبائياً مع المرضى. وأظهرت دراسة الخصائص الجينية والظاهرية لجميع الذراري المعزولة، تطابقاً وقرباً شديداً. بالإضافة لذلك، أظهرت الذراري المعزولة من الأبقار تطابقا مع ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157 SF(Sorbitol fermenting) المخمرة للسوربيتول التي تم عزلها سابقاً من حالات بمتلازمة انحلال الدم اليوريمية في ألمانيا. وتشكل هذه الدراسة أول دليل علمي يثبت أن الأبقار يمكن أن تلعب دور الثوي الخازن للإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو الـــ VTEC O157 SF المترافقة مع متلازمة انحلال الدم اليوريمية في الإنسان.

أجرى براديل وزملاءه (Pradel *et al.*, 2000) في فرنسا، دراسة لمدة سنة واحدة (من تشرين الأول 1997 وحتى أيلول 1998)، وذلك لمعرفة نسبة انتشار الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC في الأبقار. حيث قاموا بجمع العينات من روث ولحوم وجبن الأبقار واختبارها. وكانت نسبة انتشار الـــ VTEC بالاعتماد على نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل للتقصي عن الجينات المشفرّة للذيفانات السامة لخلايا فيرو (*vt1*, *vt2*): 70% في روث الأبقار (VTEC-*vt1*: 10%, VTEC-*vt2*:57%, VTEC-

VTEC-*vt1*: 39%, VTEC-*vt2*: 50%,) في لحوم الأبقار 11% ،(*vt1&vt2*: 33% VTEC-*vt1*: 33%, VTEC-*vt2*: 0%,) في الجبن 10% ،(VTEC-*vt1&vt2*: 11% VTEC-*vt1&vt2*: 67%). وعند إجراءهم اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو لـــ 210 ذرية من الـــ VTEC المعزولة في دراستهم، تبين أن 14.5% منها كانت سالبة لإنتاج الذيفان على المنبت الخلوي، بالرغم من أنها كانت إيجابية لامتلاكها الجينات المشفرة له باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد. كما وجدوا أن هناك ترافق معنوي ومهم بين عيار الذيفان السام لخلايا فيرو على المنبت الخلوي وامتلاك ذراري الـــ VTEC للجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-2. كما أظهرت نتائج التصنيف البيوكيميائي أن 12% من ذراري الـــ VTEC المعزولة كانت غير مخمرة للسوربيتول. وبيّن التنميط المصلي انتماء الذراري لـــ 73 نمط مصلي، مع الإشارة إلى أن 55% من الذراري المعزولة كانت تنتمي لـــ 13 نمط مصلي : (OX3:H2, O113:H21, O113:H4, OX3:H21, O6:H10, OX178:H19, O171:H2, O46:H38, O172:H21, O22:H16, O91:H10, O91:H21 و O22:H8)، في حين أنّ ذرية واحدة فقط تم عزلها من روث الأبقار كانت تنتمي للنمط المصلي O157:H7 (0.5% من الذراري التي تم عزلها من روث الأبقار)، وعند مقارنتهم الأنماط المصلية للـــ VTEC المعزولة في الدراسة بتلك المترافقة مع أمراض البشر، تبين أن 34% منها ترافقت مع حالات مرضية شديدة. وأشاروا إلى وجود تأثير معنوي وكبير لفصول السنة على نسبة انتشار الـــ VTEC حيث وصلت لأعلى مستوى لها في فصل الصيف(شهر آب) وذلك في كل من روث وجبن الأبقار، في حين وصلت نسبة انتشار الـــ VTEC في لحوم الأبقار إلى أعلى مستوى لها في شهر كانون الأول .

في مسح *Survey* جرثومي لتقدير نسبة انتشار الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في جلود وروث الأبقار، وعلاقتها بدرجة تلوث الذبائح بالـــ VTEC O157 في مسالخ الأبقار بالولايات المتحدة الأمريكية، قام **إيلدر وزملاءه (Elder *et al*., 2000)** بجمع عينات من روث وجلود 29 قطيع Lots أبقار مدخلة للمسالخ، كما قاموا بجمع العينات من ذبائح أبقار هذه القطعان على ثلاث مراحل: الأولى من الذبائح قبل نزع الأحشاء، الثانية

بعد نزع الأحشاء وقبل معاملة الذبائح بالصادات الحيوية، أما الثالثة فبعد معاملة الذبائح بالصادات الحيوية وتحضيرها للتبريد. ومن أصل 29 قطيع مختبر كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157: 72% في الروث، 38% في الجلود. حيث تم عزل الـ VTEC O157 بمعدل ذرية واحدة على الأقل من القطيع الذي أعطى نتيجة إيجابية. وبالنسبة للعدد الكلي من الأبقار التي تم اختبارها كانت نسبة انتشار الجرثومة: 28% في الروث، 11% في الجلود. ومن أصل 29 قطيع مختبر كانت نسبة انتشار الـ VTEC في الذبائح: 87% قبل نزع الأحشاء ، 57% بعد نزع الأحشاء وقبل معاملتها بالصادات الحيوية، 17% بعد معاملتها بالصادات الحيوية وتحضيرها للتبريد. وبالنسبة للعدد الكلي من ذبائح الأبقار التي تم اختبارها كانت نسبة انتشار الإشريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157: 43% قبل نزع الأحشاء، 18% بعد نزع الأحشاء وقبل معاملة الذبائح بالصادات الحيوية، 2% بعد معاملة الذبائح بالصادات الحيوية وتحضيرها للتبريد. وعند إجراء اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد للكشف عن امتلاك الـ 342 ذرية VTEC O157 المعزولة في الدراسة للجينات المشفرة لكل من الذيفان السام لخلايا فيرو-1 و -2 (*vt1, vt2*)، تبين أنه باستثناء ذرية واحدة كانت سلبية لكل من *vt1* و *vt2*، كانت 1% من الذراري تملك الـ *vt1* فقط، 41.2% تملك الـ *vt2* فقط، و 57.4% تملك *vt1* و *vt2* معاً. وفسَّر الباحثون الانخفاض التدريجي في نسبة انتشار الـ VTEC O157 خلال مراحل معاملتها في المسلخ، للإجراءات الصحية الناجعة المتبعة في المسالخ التي تم إجراء الدراسة فيها، وأهمها معاملة الذبائح بالصادات الحيوية قبل تبريدها.

لمعرفة الوضع الصحي لمسالخ الأبقار والأغنام في ألمانيا، قام **ستيفان وزملاءه (Stephan *et al.*, 2000)**، بجمع عينات روث من الأغنام والأبقار في المسالخ قبل ذبحها، واختبرت لوجود الإشريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC باستخدام اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل للكشف عن الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو بشكل عام *vt*. وتم في هذه الدراسة تجربة طريقتين للتقصي عن الإشريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل. حيث تضمنت الطريقة الأولى خطوة إضافية تم فيها إجراء إكثار للعينات قبل إجراء اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل، أما في الطريقة

الثانية فقد تم إجراء الاختبار للعينات فوراً بدون خطوة الإكثار. وكانت نسبة انتشار الـ VTEC بالطريقة الأولى 12% في روث الأبقار، و29.2% في روث الأغنام. في حين كانت نسبة انتشار الـ VTEC بالطريقة الثانية 6.1% في روث الأبقار، و10% في روث الأغنام. واستنتجوا أن إكثار العينات قبل الفحص خطوة ضرورية في الكشف عن الـ VTEC، وأن الكشف عن الـ VTEC بدونها سيؤدي إلى إعطاء الكثير من النتائج السلبية الكاذبة والتي ستُحدث أكبر فرق فيما لو كانت العينات غذائية المصدر.كما لوحظ تأثير كبير لعمر الأبقار على نسبة انتشار الـ VTEC حيث كانت النسبة أعلى في الحيوانات الكبيرة. في حين لم يلاحظ أي تأثير للعمر في الأغنام. وشدد الباحثون على أهمية وضرورة فحص الحمولة السطحية للذبائح من الجراثيم، قبل إرسالها إلى السلسلة الغذائية، كخطوة البداية في التحكم بالخطر الناجم عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو.

قام **كويا وزملاءه (Coia *et al.*, 2001)** بالتقصي عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157 في المنتجات الغذائية المحضرة من الأبقار في اسكتلندا، حيث قاموا بجمع عينات من اللحم والجبن والحليب الطازج من أماكن بيعها، واختبارها لوجود الـ VTEC O157 وذلك باستخدام الطرق المزرعية الجرثومية الخاصة بالـ VTEC O157 واختبارات التراص السريع، وكانت عينات الجبنة و الحليب الطازجة خالية من الـ VTEC في حين تم عزل ذريتين من الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157 (0.1%) من عينتين لحوم تم جمعها من نفس المتجر.

لفهم العلاقة التي تربط بين كل من الإشْريكيَّة القولونيَّة النّزْفية المعَويّة **(EHEC)** *EnteroHemorrhagic E.Coli* والإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC، جمع **روجيري وزملاءه (Rogerie *et al.*, 2001)** عينات من روث وذبائح الأبقار في مسالخ الأبقار في فرنسا وذلك بين آذار وآب من عام1997، وتقصّوا فيها عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو. حيث تمَّ في البداية إجراء مسح Screening أولي لجميع العينات باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل للكشف عن وجود الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو *vt*، وكانت العينة التي تعطي نتيجة إيجابية بالاختبار السابق تخضع لطرق وإجراءات عزل الإشْريكيَّة القولونيَّة بشكل عام والـ O157 بشكل

خاص (بإجراء اختبار الفصل المناعي المغناطيسي النوعي O157-Specific ImmunoMagnetic Separation). ثم كان يتم الكشف عن الجينات المشفرة لكل من الذيفان السام لخلايا فيرو-1 و -2 (*vt1*, *vt2*) باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد في جميع ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة، وفي المرحلة الأخيرة من الدراسة كان يتم إجراء التنميط المصلي للذراري التي أعطت نتيجة إيجابية لامتلاكها الجينات المشفرة لعوامل الفوعة، وذلك لمعرفة فيما إذا كانت تنتمي للأنماط المصلية المترافقة مع الإشْريكيَّة القولونيَّة النزفية المعوية EHEC. وفي المسح الأولي أعطت 18.1%، 10.7% من عينات الروث والذبائح نتائج إيجابية لامتلاكها الـ *vt*، على التوالي. وتم عزل 222 ذرية من الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو من العينات الإيجابية بالمسح الأولي حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC: 7.9%، 1.9% في الروث والذبائح على التوالي، وكانت 77% من الذراري المختبرة تملك واحداً فقط من الجينات المشفرة للذيفانات السامة لخلايا فيرو (إما *vt1* أو *vt2*)، مع الإشارة لأنه تم عزل 8 ذراري فقط من الإشْريكيَّة القولونيَّة O157 وذلك من الروث ولم تكن أي من هذه الذراري الثمانية تملك أياً من الجينات المشفرة لعوامل الضراوة المختبرة. ومن أصل 222 ذرية VTEC مختبرة كانت هناك 4 ذراري فقط تنتمي للأنماط المصلية المترافقة مع الـ EHEC (ذريتين من كل من EHEC-O26 و EHEC-O111). واستنتج الباحثون من هذه الدراسة أنه يجب إعطاء الأهمية في الأبحاث والدراسات المعنية بالسلامة الغذائية والصحة العامة للطرق المخبرية التي تكشف عن امتلاك ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة لعوامل الفوعة الخاصة بالإشْريكيَّة القولونيَّة النزفية المعوية وليس لأنماط مصلية محددة حيث أنَّ أي ذرية من الإشْريكيَّة القولونيَّة تملك أحد عوامل الضراوة الخاصة بالإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو بشكل عام والإشْريكيَّة القولونيَّة النزفية المعوية بشكل خاص (حيث أنها جزء من المجموعة السابقة) يمكن أن تعد سببا محتملا للإصابة بمتلازمة انحلال الدم اليوريمية أو التهاب القولون النزفي، وذلك بغض النظر عن النَمَط المَصَليّ الذي تنتمي إليه.

أجرى شابمان وزملاءه (Chapman *et al.*, 2001) دراسة لمدة سنة واحدة بحثاً عن وجود الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو VTEC O157 في الأبقار

والأغنام في المملكة المتحدة. حيث قاموا بجمع عينات من روث وذبائح الأبقار والأغنام في المسالخ بالإضافة لجمعهم عينات من اللحوم الطازجة من أماكن بيعها، وأظهرت نتائج استخدام طريقة الزرع على المنبت أحادي الطبقة واختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد وجود الذيفان السام لخلايا فيرو. وكانت نسبة انتشار الإشْرِيكِيَّة القولونِيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157: 12.9%، 7.4%، 1.4% ، 0.7%، 0.44% في روث الأبقار، روث الأغنام ، ذبائح الأبقار، ذبائح الأغنام، اللحوم الطازجة على التوالي، مع الإشارة لأن نسبة انتشار الجرثومة كانت أكثر في لحوم الأغنام. وعند مقارنة الذراري المعزولة في الدراسة مع ذراري VTEC O157 معزولة سابقاً من حالات بمتلازمة انحلال الدم اليوريمية حصلت في نفس الفترة التي أجريت فيها الدراسة، تبين حدوث تطابق بنسبة 92% بينهما.

لمعرفة الحمولة الجرثومية من الإشْرِيكِيَّة القولونِيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157 في روث الأبقار، وتأثيرها على معدل تلوث الذبائح بالـ VTEC O157 في المسالخ بإيطاليا، أجرى **بوناردي وزملاءه (Bonardi *et al.*, 2001)** دراسة لتقرير نسبة انتشار الإشْرِيكِيَّة القولونِيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157 خلال مدة سنة كاملة (من نيسان 1998 وحتى كانون ثاني 1999) وذلك في عينات تم جمعها من روث وذبائح الأبقار (بعد نزع الأحشاء) في المسالخ بشمال إيطاليا. وكانت نسبة الانتشار الكلية للـ VTEC O157: 17% في الروث (94.1% من ذراري الـ VTEC O157 تم عزلها من العينات تم جمعها خلال شهر تموز)، 12% في ذبائح الأبقار (58.3% من ذراري الـ VTEC O157 تم عزلها من العينات تم جمعها خلال شهر تموز). وعند الربط بين إيجابية كل من العينة المأخوذة من الروث والمأخوذة من الذبيحة معاً، فإن نسبة انتشار الـ VTEC O157 سترتفع لـ 35.5% في الذبائح التي أعطت عينة الروث منها نتيجة إيجابية، وستنخفض لـ 7.3% في الذبائح التي أعطت عينة الروث فيها نتيجة سالبة لوجود الـ VTEC O157. واستنتج الباحثون من نتائج هذه الدراسة التأثير الكبير لفصول السنة على نسبة انتشار الإشْرِيكِيَّة القولونِيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في روث الأبقار حيث أنها ترتفع بشكل كبير في الأشهر الحارة من السنة، وأن نسبة انتشار الجرثومة في لحوم الأبقار

في المسالخ تتناسب طرداً مع نسبة انتشارها في الروث وذلك بغياب تطبيق الإجراءات الصحية التي ينصُّ عليها برنامج نِظامُ نِقاطِ التَّحكُّمِ الحَرِجَةِ لتَحْليلِ المَخاطِر **HACCP**.

تقصى **بروكس وزملاءه (Brooks *et al.*, 2001)** عن نسبة انتشار الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو وشاكلة عوامل الضراوة التي تملكها وذلك في لحوم كل من الأبقار والأغنام والخنازير في نيوزلندا. وتضمن البحث في البداية إجراء خطوة إكثار للعينات. وكانت نسبة انتشار الـ VTEC 12% في لحوم الأبقار، 17% في لحوم الأغنام، 4% في لحوم الخنازير. وكانت جميع الذراري المعزولة تملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-2 والذي يعتبر من أهم عوامل الضراوة التي تملكها الـ VTEC ويمكنها من التسبب بالمرض في الإنسان.

لمعرفة نسبة انتشار الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في الأبقار والخنازير في الصين ، قام **ليونغ وزملاءه (Leung *et al.*, 2001)** بجمع عينات من روث وذبائح كل من الأبقار والخنازير وذلك من المسلخ المركزي في هونغ كونغ، واختبارها لوجود الـ VTEC، وذلك بطرق الزرع والتصنيف الجرثومي التقليدية في البداية لعزل جراثيم الإشْريكيَّة القولونيَّة، ثم اختبار سمية هذه الذراري على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، والكشف عن امتلاكها للجينات المشفرة لكل من الذيفان السام لخلايا فيرو-1 و-2 باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد. حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC : 42.8% في روث الأبقار، 1.8% في ذبائح الأبقار، 2.1% في روث الخنازير، 0.2% في ذبائح الخنازير. مع الإشارة لأن 73.8% من ذراري الـ VTEC المعزولة من الأبقار كانت حاملة لكل من *vt1* و *vt2* . وعند إجراء التنميط المصلي للذراري المعزولة من الأبقار تبين أن 2.2% منها فقط كانت تنتمي للنمط المصلي VTEC O157:H7. في حين شكلت الـ VTEC Non-O157 97.8% من الذراري المعزولة، وانطلاقاً من هذه النتائج أكد الباحثون على أن الاعتماد الكلي لمعظم المخابر التشخيصية البشرية على منبت الـ SMAC في التقصي عن سبب حالات الإسهال المترافقة بالـ VTEC من شأنه أن يبقي دور الـ VTEC Non-O157 مجهولاً، وبالتالي ستبقى هناك الكثير من الحالات المرضية مجهولة السبب. كما أشاروا إلى أن التركيز على استهلاك لحوم الخنازير والدجاج هو السبب

في قلة حالات الإسهال المترافقة بالـ VTEC في الصين، نظراً لنسبة انتشارها المرتفعة نوعاً ما في لحوم الأبقار.

في النمسا، أجرى **مبروك (مبروك، 2002)** بحثاً لمعرفة مدى تلوث اللحوم بالإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157:H7، حيث قام بجمع عينات من لحوم الأغنام والدجاج والحبش والخنازير وذلك من أماكن بيعها، واختبارها لوجود الجرثومة واستخدم في ذلك طريقة الفصل المناعي المغناطيسي النوعي، وأعطت جميع العينات نتيجة سالبة لوجود الـ VTEC O157H7.

لم يجد **ساندهو وغايلس (Sandhu and Gyles, 2002)** فرقاً في التفاعل الذي تظهره أمعاء العجول مع الذيفان السام لخلايا فيرو الذي تنتجه الأنماط المصلية المرضية SeroPathoType المختلفة للإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو، وذلك عند مقارنتهم بين التأثيرات المرضية للأنماط المصلية التي تترافق عادة مع زحار العجول Calf Dysentery (O5:H-, O26:H11, O111:H- , O113:H21) وتلك التي لا تترافق مع أمراض العجول VTEC O157:H7 ولكنها تترافق مع متلازمة انحلال الدم اليوريمية. كما أشارا في الدراسة التي قاما بها أن الدجاج غير صالح كحيوان تجارب لدراسة التفاعلات بين الذيفان السام لخلايا فيرو والأمعاء.

وفي دراسة لنسبة انتشار الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC Non-O157 وشاكلة عوامل الضراوة التي تملكها في مسالخ الأبقار بالولايات المتحدة الأمريكية، قام **آرثر وزملاءه (Arthur *et al.*, 2002)** في تموز 1999 بجمع العينات من ذبائح الأبقار في المسالخ على مرحلتين، الأولى قبل نزع الأحشاء والتجويف Pre-Evisceration والثانية بعد معاملة الذبائح Post-Processing (نزع الأحشاء Post-Evisceration وتطبيق معاملة الذبائح بمضادات الجراثيم Antimicrobial Interventions ووضعها في المبرد)، واختبارها، حيث بينت النتائج أن نسبة انتشار الـ VTEC Non-O157 54% في ذبائح الأبقار قبل نزع الأحشاء ، و8% بعد معاملة الذبائح، وأشاروا إلى وجود بعض العينات التي كانت سالبة قبل نزع الأحشاء ولكنها أعطت نتائج

إيجابية في مرحلة ما بعد المعاملة. وتم عزل 361 ذرية في هذه الدراسة، وقد بيّن التنميط المصلي أنها تنتمي لـ 41 زمرة مصلية مختلفة، 49% منها معروف بترافقه مع كل من الـ HUS والـ HC في البشر، مع العلم أن كلا من الزمر المصلية O111 , O26 لم تكن بينها، في حين كانت 49% من الذراري المعزولة تنتمي لـ 8 أنماط مصلية : (O8, O2, O171, O142, O132 O121, O113 O88)، مع الإشارة لأن النَمط المَصْلِيّ O142 (والذي نادراً ما صنف ضمن الـ VTEC) كان أكثرها انتشاراً. وأظهر اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل للتقصي عن الجينات المشفرة لكل من الذيفان السام لخلايا فيرو-1 *vt1* والذيفان السام لخلايا فيرو-2 *vt2*، أن 47.1% من الذراري تملك الـ *vt1*، 36.6% تملك الـ *vt2*، و16.3% منها تملك الاثنين معاً (*vt1&vt2*). ونوهوا إلى أن وجود الجرثومة بنسب مرتفعة يعود إلى جمع العينات خلال شهر الذروة من فصل الصيف، وأنها يمكن أن تنخفض كثيرا لو تم جمع العينات في أوقات أخرى من السنة. كما استنتجوا أن معاملة الذبائح بمضادات الجراثيم هو السبب الرئيسي في تخفيض نسبة انتشار الجرثومة في الذبائح بعد المعاملة .

جمع **بلانكو وزملاءه** (**Blanco *et al.*, 2003**) 1300 عينة روث من أغنام سليمة موزعة في 93 قطيع في اسبانيا عام 1997، وتقصّوا فيها عن الإِشْرِيكِيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC، وكانت نسبة انتشار الإِشْرِيكِيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو 36%،0.4% لكل من الـ VTEC Non-O157 والـ VTEC O157 على التوالي. وتم عزل 384 ذريّة VTEC في هذه الدراسة أظهر إجراء اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد عليها أن 55% منها تملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1، و3% تملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-2، و42% من الذراري تملك الاثنين معاً (*vt1&vt2*). كما تم العثور على الجينات المشفرة لكل من الحالَّة الدَمَوِيَّة المِعَوِيّة (*ehxA*) والأنتيمين (*eae*) في 28%،6% من ذراري الـ VTEC المعزولة على التوالي. وكانت الذراري موزعة في 35 زمرة مصلية و64 نَمَط مَصْلِيّ O:H (والتي تضم 18 نمط مصلي جديد). وكانت 72% من الذراري من الأنماط المصلية التالية: (O5:H-, O6:H10, O117:H-, O128:H2, O128:H-, O136:H20,

(O146:H8, O146:H21, O156:H-, O166:H28,, ONT:H21 وتعني ONT أنها غير قابلة للتنميط. وبالرغم من أن 384 ذرّية كانت تنتمي لـ 95 نمط مرضي مصلي مختلف (*SeroPathoType* الترابط بين النوع المصلي وجينات الضراوة)، فإن 49% من الذراري كانت تنتمي لـ 11 نَمَط مَصلِيّ مرضي فقط، كان النمط O91:H- *vt1 vt2* هو أكثرها شيوعاً، يتبعه الـ O128:H- *vt1 vt2* ثم الـ O6:H10 *vt1*. وأشاروا إلى الأهمية البالغة للأغنام السليمة كأثوياء خازنة لذراري الـ VTEC المترافقة مع أمراض الإنسان.

قام **توتينيل وزملاءه (Tutenel *et al.*, 2003)** بجمع عينات من اللحوم الموجودة في المسالخ ومتاجر اللحوم في بلجيكا، والتقصي فيها عن الإشْرِيكِيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157. ووجدوا أن نسبة انتشار الـ VTEC O157 0.18% في لحوم الأبقار المفرومة، 1.02% في ذبائح الأبقار بعد نزع الأحشاء، 1.17% في ذبائح الخنازير بعد نزع الأحشاء، في حين أعطت جميع عينات لحوم الدجاج المختبرة نتائج سالبة. كما أشارت النتائج أن جميع الذراري المعزولة تملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو، باستثناء ذرية واحدة تم عزلها من ذبائح الخنازير.

قام أوميساكين وزملاءه (Omisakin *et al.*, 2003) بدراسة تركيز وانتشار الإشْرِيكِيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في روث الأبقار وقت الذبح في أيار من عام 2002. حيث تم جمع 589 عينة روث من مستقيم الأبقار المعدة للذبح، وتم تقدير معدل انتشار الـ VTEC بـ 40.4%. وكانت جميع الذراري المعزولة تملك الجين المشفر لـ *vt2*. وأشاروا إلى أن وجود روث الحيوانات الحاوي على نسبة انتشار مرتفعة من الـ VTEC في المسلخ يزيد من الخطر الكامن لتلوث الذبائح أثناء عملية الذبح ويؤكد على الحاجة الماسة لتطبيق إجراءات نِظام نِقاطِ التَّحَكُّمِ الحَرِجَةِ لتَحْلِيلِ المَخاطِر Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP).

نتيجة الخطورة الكبيرة التي تشكلها الإشْرِيكِيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157:H7 على الصحة العامة، والدور الكبير الذي تلعبه الأبقار كثوي خازن لهذا النَّمَط المَصلِيّ، أجرى سيد وحسين **(سيد وحسين، 2003)** دراسة في جمهورية مصر لتحديد

دور الأبقار الحلوب السليمة ظاهرياً كمصدر للعدوى بهذه الجرثومة، حيث تم جمع عينات روث وحليب من الأبقار في المزارع بالإضافة لجمع عينات حليب من أماكن بيعها في مناطق مختلفة من محافظة أسيوط وذلك في الفترة الواقعة بين تموز وأيلول من عام 2002. وأشارت النتائج إلى وجود هذه الجرثومة في العينات المختبرة بنسبة 12.73%، حيث توزعت على الشكل التالي: 30% في الروث، 2.5% في الحليب من المزارع ، 3.33% في الحليب من أماكن البيع. وتبيّن هذه الدراسة أن الأبقار السليمة ظاهرياً تلعب دوراً هاماً كمصدر للـ VTEC O157:H7 في جمهورية مصر وتشكل بالتالي خطراً على صحة الإنسان فيها.

وفي دراسة أخرى أجريت لتحديد مدى تلوث الأغذية المصرية بالإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157:H7، قام **الصافي والرعوف (الصافي والرعوف، 2003)** بجمع عينات من المنتجات الغذائية الشائعة في الأسواق المصرية واختبارها لوجود هذه الجرثومة. حيث أشارت النتائج إلى وجود الـ VTEC O157:H7 بنسبة 5% في اللحوم البقرية الطازجة، 5% في الهمبرغر ، 5% في لحوم الدجاج، 4% في لحوم الأغنام، 5% في الحليب. وكانت جميع الذراري المعزولة منتجة لكل من الذيفان السام لخلايا فيرو-1و-2 عند اختبارها.

لمعرفة مدى تلوث ذبائح الأغنام بالإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو أثناء معاملتها في مسالخ الأغنام بهدف تقييم وتطوير الإجراءات المتبعة في الرقابة الصحية على اللحوم في سويسرا. قام **زويفيل وستيفان (Zweifel and Stephan, 2003)** بفحص الحمولة الجرثومية من الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في ذبائح الأغنام بعد نزع الأحشاء. حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC 36.6% في ذبائح الأغنام، وأشارت النتائج إلى أن 57.1% من ذراري الـ VTEC تملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-2 *vt2*. واستخلص الباحثان من نتائجهم أن لحوم الأغنام تشكل أحد أهم المنافذ التي تخترق من خلالها الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو السلسلة الغذائية في سويسرا، وأن نقطة البداية للتحكم بها هي المسلخ، حيث نصحوا بإجراء فحص جرثومي لـ 10 ذبائح شهرياً كإجراء روتيني للتحقق من صحة الإجراءات في المسالخ، وبالتالي سلامة اللحوم التي يتم تقديمها للمستهلك.

لمعرفة التأثير الموسمي على نسبة انتشار الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في مسالخ الأبقار في الولايات المتحدة الأمريكية، قام **غالاهار وزملاءه (Gallagher *et al.*, 2003)** بالتقصي عن الـ VTEC في كل من الروث، الجلود Hides، والذبائح قبل نزع الأحشاء *Preevisceration*، وبعد نزع الأحشاء *Posteviscertion*. حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157:H7: 5.9% في الروث، 60.6% في الجلد، 26.7% في ذبائح الأبقار قبل نزع الأحشاء، 1.2% في ذبائح الأبقار بعد نزع الأحشاء. وكانت نسبة انتشار الـ VTEC Non-O157: 34.3% في الروث، 92% في الجلد، 96.6% في ذبائح الأبقار قبل نزع الأحشاء، 16.2% في ذبائح الأبقار بعد نزع الأحشاء. ولاحظوا أن نسبة انتشار الـ VTEC في الروث تصل للذروة خلال فصل الصيف، في حين أن نسبة انتشار الـ VTEC في الجلود والذبائح قبل وبعد نزع الأحشاء كانت تصل للقمة خلال فصل الخريف. وعزوا الانخفاض الشديد لتواجد الجرثومة في الذبائح بعد نزع الأحشاء، للخطوات والإجراءات الصحية الصارمة المتبعة في المسالخ التي تم إجراء البحث فيها، وأهمها معاملة الذبائح بعد نزع الأحشاء بمضادات الجراثيم Antimicrobial Interventions. كما اعتبروا الجلود أحد أهم مصادر تلوث ذبائح الأبقار بالإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في المسالخ.

ولمعرفة الدور الذي تلعبه الأغنام في نقل الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC، التي تسببت بالعديد من الأوبئة بمتلازمة انحلال الدم اليوريمية والتهاب القولون النزفي في ولاية نيفادا بالولايات المتحدة الأمريكية، قام **حسين وزملاءه (Hussein *et al.*, 2003)** بجمع عينات من روث الأغنام لمدة سنة كاملة (من صيف 1999 وحتى صيف 2000) واختبارها لوجود الجرثومة. وكانت نسبة انتشار الـ VTEC 8.2% في العينات المجموعة (VTEC-*vt1*:39% ,VTEC-*vt2*: 0%, VTEC-*vt1&vt2*: 61%)، وعند إجراء التنميط المصلي للذراري المعزولة لم تكن أي منها تنتمي للنمط المصلي O157:H7 (0%)، في حين كان هناك نمطان مصليان سائدان هما النَمَط المَصْلِيّ -O91:H (61% من الذراري المعزولة)، والنَمَط المَصْلِيّ -O128:H (22% من الذراري

المعزولة)، واللذان تسببا بالعديد من حالات متلازمة انحلال الدم اليوريمية في البشر. واستنتج الباحثون أن الأغنام تشكل أحد أهم الأثوياء الخازنة للـــ VTEC الممرضة للبشر.

أجرى نيلسن وزملاءه (Nielsen *et al.*, 2004) مسحاً لعينات روث قاموا بجمعها من الحيوانات البرية والقوارض التي تتواجد بالقرب من حيوانات المزرعة، بحثاً عن الإِشْرِيكِيَّة القولونِيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فِيرو. وكان معدل انتشار الجرثومة ضعيفاً بشكل عام في العينات المفحوصة. مع الأخذ بعين الاعتبار أنَّ الذراري التي عزلت من الجرذان، كانت مطابقة تماماً لتلك المعزولة من الأبقار في تلك المزارع من ناحية النَمَط المَصْلِيّ وعوامل الضراوة. واستنتجوا من ذلك أن الطيور البرية والقوارض ربما تصاب بالخمج نتيجة الاحتكاك مع حيوانات المزرعة والعكس صحيح .

في تقييم لمستوى الأمن الصحي في المطاعم في جمهورية التشيك، قام **لوكاسوفا وزملاءه (Lukásová *et al.*, 2004)** بجمع عينات غذائية متنوعة من مطاعم الوجبات السريعة واختبارها لوجود الإِشْرِيكِيَّة القولونِيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157:H7. كما جمعوا عينات من روث وذبائح كل من الأبقار والخنازير في المسالخ. وتم الكشف عن الـــ VTEC O157:H7 بعزل المستعمرات الغير مخمرة للسوربيتول النامية على منبت الـــ CT-SMAC، وذلك بعد تحضين العينات لمدة 18 ساعة على الدرجة 44 مْ، والكشف عن امتلاكها للجينات المرمزة لكل من الذيفان السام لخلايا فيرو- 1 و -2 (*vt1*, *vt2*) باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد. وكانت نسبة انتشار VTEC O157:H7 2.2% في العينات المجموعة (0.9% في لحم الدجاج منزوع العظم بشكل يدوي، 0.6% في اللحوم البقرية المفرومة، 0.4% في الحليب البقري الخام، 0.1% في ذبائح الأبقار بعد نزع الأحشاء، 0.2% في الفَضَلات السائِلَة Waste Water في المطاعم، 0% في كل من السجق sausages وروث ولحوم ذبائح الخنازير وروث الأبقار وذبائح الدجاج الكاملة) ، وعند إجراء اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد لهذه الذراري تبين أن: 66.6% من الذراري المعزولة من لحوم الأبقار المفرومة، و100% من الذراري المعزولة من الحليب وذبائح الأبقار والفَضَلات السائِلَة تملك كلا من الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 و -2 (*vt1*&*vt2*)، في حين كانت جميع الذراري المعزولة من لحوم الدجاج تملك أحدهما فقط

(إما *vt1* أو *vt2*). كما بين اختبار الحساسية للصادات الحيوية أن 95.4% من الذراري المعزولة مقاوم لكل من الأمبيسيلين Ampicillin والسيفاميسين Cephalozine. وانطلاقاً من هذه النتائج استخلص الباحثون أنه بالرغم من نسبة الانتشار المنخفضة نوعاً ما للـ VTEC O157:H7 في عينات اللحوم البقرية المفحوصة في الدراسة، إلا أنها تشكل نقطة الاختراق الأساسية للجرثومة في السلسلة الغذائية، وأن عدم إتباع العاملين والمشرفين على تحضير وتقديم الوجبات الغذائية في المطاعم للإجراءات والطرق الصحية السليمة والنظافة الشخصية Personal Hygiene تعزز فرص حدوث التلوث التصالبي للأغذية، وتزيد من احتمال الإصابة بالأمراض التي تسببها الـ VTEC O157:H7.

تقصى رينتر وزملاءه (**Renter *et al.*, 2004**) عن أنماط مصلية محددة من الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في روث الأبقار المعدة للذبح. وذلك بعزل الإشْريكيَّة القولونيَّة من العينات المجموعة باستخدام الطرق التقليدية للزرع والتصنيف الجرثومي في البداية، ثم إجراء اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد لجميع المستعمرات المشتبهة، وبعدها قاموا باختبارات التراص للكشف عن انتماء هذه الذراري لكل من الأنماط المصلية التالية : O157:H7، O26:H11، O111:H8. وكانت نسبة انتشار الـ VTEC بشكل عام 92%. في حين كانت نسبة الـ O157:H7 8%، O111:H8 13%، O26:H11 20%. وأكدوا على الحاجة الماسة لإجراء أبحاث ودراسات إضافية لتقرير مدى الخطورة التي تشكلها هذه الأنماط المصلية على الصحة البشرية نظراً لوجودها بنسب مرتفعة نسبياً في روث الأبقار.

ولمعرفة الدور الذي تلعبه الأغنام كثوي خازن للإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في سويسرا، قام زويفل وزملاءه (**Zweifel *et al.*, 2004**) بجمع عينات من روث الأغنام المتواجدة في المسلخ الرئيسي بسويسرا، واختبارها. وتم عزل الـ VTEC من 29.9% من العينات المفحوصة، وبين اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد أن 55.7% من الذراري المعزولة تملك الجين المرمز للذيفان السام لخلايا فيرو-2. واستنتجوا أن الأغنام أحد أهم الأثوياء الخازنة للإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في سويسرا، وأن ضعف درجة الأمن الحيوي الصحي في مسالخ الأغنام تشكل نقطة البداية في اختراق

الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو الممرضة للإنسان للسلسلة الغذائية Food Chain، ونصحوا بإجراء فحص جرثومي لجميع الذبائح بعد نزع الأحشاء وقبل التبريد، لمعرفة حمولتها السطحية من الـــ VTEC تفاديا للخطر الذي تشكله هذه الجرثومة على صحة البشر.

درس دجوجيفيك وزملاءه (**Djordjevic *et al.*, 2004**) انتشار ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو **VTEC** في الأغنام في استراليا. وذلك بجمع عينات من روث الأغنام التي ترعى مع الأبقار، واختبارها لوجود الجرثومة. وكانت نسبة انتشار الـــ **VTEC** 40% في العينات المجموعة. وتم عزل 248 ذرية من الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في هذه الدراسة، وبين اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل أن 3.5% منها يملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-2، و17.5% يملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1، و79% يملك الاثنين معاً (*vt1&vt2*). وكانت تلك الذراري تنتمي لـــ 67 نَمَط مَصْليّ من الـــ **VTEC**، كان بينها 21 نمط مصلي جديد لم يتم تسجيلها من قبل. واستنتجوا أن الأغنام الاسترالية قابلة للاستعمار بأنماط مصلية خاصة بها من الـــ **VTEC** وأنها تشكل ثوي خازن رئيسي لهذه المجموعة المرضية.

جمع مورفي وزملاءه (**Murphy *et al.*, 2005**) 800 عينة من لحوم الأبقار المفرومة من أماكن جغرافية مختلفة في ايرلندا وذلك للتقصي عن وجود الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في هذه العينات وبالأخص الأنماط المصلية O26. ودلت النتائج على وجود الـــ O26 في 0.25% من العينات. وكانت هذه الذراري سالبة لوجود الجينات المُشفِّرة للذيفانات السامة لخلايا فيرو (*vt1&vt2*) والحالَّة الدَمَويَّة المِعَويّة (*ehxA*) والجينات الخاصة بالآفات الطامسة والماحية(*eae*). كذلك أعطت جميع العينات نتائج سالبة لوجود الـــ O111، وأشاروا إلى أنه على الرغم من عدم ضراوة ذراري الـــ O26 فإن مجرَّد وجودها في اللحوم يشير إلى حدوث تلوث بالروث مما يشكل تهديداً بحد ذاته للصحة العامة.

لتقييم المستوى الصحي للإجراءات المتبعة في المسالخ في الجزائر، قام **شاهد وزملاءه** (**Chahed *et al.*, 2006**) بالتقصي عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا

فيرو في ذبائح الأبقار في المسالخ بالجزائر وذلك بجمع عينات من الذبائح بعد مرحلة نزع الأحشاء Postevisceration واختبارها. وكانت نسبة انتشار الـ VTEC 20% في العينات المجموعة (VTEC Non-O157: 13%, VTEC O157:H7: 7%). وتم عزل 18 ذرية تنتمي للنمط المصلي O157:H7 كانت 78% منها تملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-2. واستنتجوا أن نسبة الانتشار المرتفعة للـ VTEC بشكل عام والـ VTEC O157:H7 بشكل خاص والتي تعتبر أحد أهم مسببات الأمراض المنقولة بالغذاء Food Born disease في العالم، تشير إلى تدني مستوى الإجراءات الصحية المطبقة في المسالخ بالجزائر ويستوجب تسليط الضوء عليها، وخاصة أنّ لحوم الأبقار تشكل أهم نقطة لدخول الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو للسلسلة الغذائية.

استقصى **كارني وزملاءه** (**Carney *et al.*, 2006**) عن نسبة انتشار الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو من الزمرة المصلية O157 في ذبائح الأبقار بالمسالخ في أيرلندا. وأجريت الدراسة للكشف عن وجود الإشْريكيّة القولونيّة O157 غير المخمرة للسوربيتول في البداية وذلك بالزرع المباشر على وسط آغارُ ماكُونكي بالسوربيتول المضاف إليه السيفكسيم وتيلُوريت البُوتاسيُوم CT-SMAC، ثم إجراء اختبارات التراص لجميع المستعمرات المشتبهة، بعدها تم استخدام اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد للكشف عن الجينات المشفرة لكل من الذيفان السام لخلايا فيرو-1و-2 (*vt1*, *vt2*,) في جميع الذراري الإيجابية. ودلت النتائج على وجود الـ VTEC O157 بنسبة 3.0% من العينات، وكانت جميع الذراري المعزولة إيجابية لامتلاكها كلٍ من *vt1*,*vt2* عند إجراء اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.

قام **ريغوبيلو وزملاءه** (**Rigobelo *et al.*, 2006**) بجمع عينات من ذبائح العجول بين عامي 2003 و 2005 وذلك من المسالخ في البرازيل، وتم مسح العينات بحثاً عن الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو. وأظهرت النتائج وجود الـ VTEC في ذبيحة واحدة بين الـ 80 ذبيحة المفحوصة (1.25%)، وتبين امتلاك الذرّية المعزولة من هذه الذبيحة للجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-2 باستخدام تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.

في أول دراسة من نوعها في إسبانيا، قام مورا وزملاءه (**Mora *et al.*, 2007**) بدراسة استمرت لمدة 8 سنوات (1995 – 2003)، لتقدير نسبة انتشار الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو (VTEC (O157 & Non-O157 في اللحوم البقرية المفرومة. وكان متوسط نسبة انتشار الـــ VTEC 12% (17%، 9%، 12%، 14%، 9%، 5%، 13%، وذلك من عام 1995 وحتى عام 2003 على التوالي)، حيث كان متوسط نسبة انتشار الـــ VTEC Non-O157 11% (14%، 9%، 12%، 14%، 8%، 5%، 13%، وذلك من عام 1995 وحتى عام 2003 على التوالي)، في حين كان متوسط نسبة انتشار الـــ VTEC O157 1% (5%، 0%، 0.6%، 0.8%، 1.3%، 0%، 0.9%، وذلك من عام 1995 وحتى عام 2003 على التوالي)، وتم عزل 96 ذرية VTEC في هذه الدراسة، بيَّن التنميط المصلي أنها تنتمي لـــ 42 زمرة مصلية، و61 نمط مصلي بينها 10 أنماط مصلية جديدة، مع الإشارة إلى أن غالبية الذراري المعزولة 68% كانت تنتمي لأنماط مصلية معروفة بترافقها مع أمراض شديدة في البشر. وأظهر اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد أن 29% من الذراري تملك الـــ *vt1*، 51% من الذراري تملك الـــ *vt2*، و20% تملك الاثنين معاً (*vt1&vt2*). وتبين أن هناك 10 ذراري تنتمي للأنماط المصلية المرضية *SeroPathoType* التالية ، O157:H7 *vt2*، O26:H11 *vt1*، O157:H7 *vt1&vt2*، والتي تسبب أعراضاً شديدة لمُتَلازِمَةُ انْحِلاَلِ الدَّمِ-اليوريمية HUS في البشر. وأشاروا إلى أن أفضل نتائج في التقصي عن الجرثومة، تم الحصول عليها عندما تم تحضينها (بعد الإكثار) على منبت الـــ CT-SMAC وMAC لمدة 18 ساعة بدرجة حرارة 44 مْ. وخرجوا بنتيجة أن الـــ VTEC Non-O157 في لحوم الأبقار تشكل خطراً كبيراً ومستتراً يهدد الصحة العامة البشرية وذلك كون معظم الأبحاث التي أجريت على الـــ VTEC ركزت على الـــ VTEC O157:H7 وأهملت بقية الأنماط المصلية. وأكدوا على الحاجة الماسة لتطبيق برامج نِظامُ نِقاطِ التَّحكُّمِ الحَرِجَةِ لتَحْلِيلِ المَخاطِر HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) خلال جميع مراحل السِلْسِلَة الغذائية Food Chain.

أجرى **مارتيناز وزملاءه (Martínez *et al.*, 2007)** دراسة استهدفت تمييز خصائص ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو المعزولة من لحوم الأبقار والهمبرغر في كولومبيا باستخدام اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد. حيث تم اختبار 189 ذرّية VTEC لوجود الجينات التالية: *uidA* (خاص بالإشْريكيَّة القولونيَّة O157)، *vt1*، *vt2*. وقد وجدوا أن 40% من هذه الذراري تملك كلاً من *vt1* و*vt2*، و40% منها كانت إيجابية لوجود *vt2* فقط و 20% منها كانت إيجابية لوجود *vt1* فقط، ولم تعطي أي من الذراري المختبرة نتائج لوجود لـ *uidA* الخاص بالإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157:H7. وتؤكد نتائج هذه الدراسة ما ذكر في بيانات الدراسات السابقة التي تم إجرائها في كولومبيا عن الانتشار المنخفض للإشريكية القولونيَّة VTEC O157:H7، وهي الأولى التي أعطت تقريراً عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC Non-O157 في هذا البلد.

ولفهم العلاقة التي تربط بين نسبة انتشار الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157:H7 الموجودة في الروث مع تلك الموجودة في ذبائح الأبقار في مسالخ الأبقار بإيطاليا، جمع **أولونسو وزملاءه (Alonso *et al.*, 2007)** عينات من كل من روث وذبائح الأبقار بعد نزع الأحشاء في المسالخ، وتقصى فيها عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157:H7. وكانت نسبة انتشار الـ O157:H7 الغير مخمرة للسوربيتول : 24% في روث الأبقار، و11% في ذبائح الأبقار بعد الذبح. وبين اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل أن 81.8% من ذراري الـ O157:H7 المعزولة من الروث و40% من الذراري المعزولة من الذبائح تملك الـ *vt*. كما بينت المقارنة الجينية لذراري VTEC O157:H7 المعزولة من الروث مع تلك المعزولة من الذبائح، حدوث تطابق بين بعض ذراري الـ VTEC O157:H7، حيث كان يتم عزل نفس الذرية أحياناً من نفس الحيوان ولكن مرة من الروث ومرة من الذبيحة، وهذا ما يشير قطعاً إلى حدوث تلوث للذبيحة بالروث أثناء المعاملة.

قام **كالشاياناند وزملاءه (Kalchayanand *et al.*, 2007)**، بدراسة شاملة عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في مسالخ الأغنام في الولايات المتحدة الأمريكية

خلال جميع مراحل عملها، كمؤشر يعكس مستوى الإجراءات الصحية المتبعة في هذه المسالخ أولاً، ونظراً لما تشكله الـ VTEC بحد ذاتها، من خطورة كبيرة على الصحة العامة البشرية ثانياً. حيث قاموا بجمع العينات من الأغنام في المسالخ على ثلاث مراحل: الأولى من الصوف قبل ذبح الأغنام، والثانية من ذبائح الأغنام قبل نزع الأحشاء، والثالثة من الذبائح بعد نزع الأحشاء. وكانت نسبة انتشار الـ VTEC O157:H7 : 21.8%، 1.6%، 2.9% في الصوف والذبائح قبل نزع الأحشاء والذبائح بعد نزع الأحشاء على التوالي . في حين كانت نسبة انتشار الـ VTEC Non-O157 : 86.2%، 78.6%، 81.6% في الصوف والذبائح قبل نزع الأحشاء والذبائح بعد نزع الأحشاء على التوالي. وبيّن التنميط المصلي انتماء ذراري الـ VTEC Non-O157 المعزولة إلى 69 نمط مصلي، مع الإشارة إلى أن 40.8% من الذراري المعزولة كانت تنتمي للنمط المصلي VTEC O91:H14، و18.4% منها ينتمي للنمط المصلي VTEC O5:H19.

ولمعرفة الاختلافات الموسمية لنسبة انتشار الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو O157:H7 وشاكلة عوامل الضراوة التي تملكها هذه الجرثومة، وذلك في الأغنام بايرلندا . قام **لينهان وزملاءه** (**Lenahan *et al*., 2007**) بجمع عينات من الأغنام في المسالخ (روث، صوف، ذبائح قبل نزع الأحشاء، ذبائح بعد نزع الأحشاء) وذلك لمدة 13 شهر، واختبارها. حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157:H7: 0% في الروث، 5.75% في الصوف، 1.5% في الذبائح قبل نزع الأحشاء، 1% بعد نزع الأحشاء. وعند إجراء اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد للـ 29 ذرية VTEC O157:H7 المعزولة في هذه الدراسة تبين أن 82.2% يملك كلا من الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 و-2 في حين كان 17.8% منها يملك الـ *vt2* فقط. ولم تكشف الدراسة عن فرق معنوي للموسم على نسبة انتشار الـ VTEC O157:H7. ولكنها كشفت النقاب عن الدور الحاسم الذي تلعبه الأغنام في أيرلندا في نقل الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو O157:H7 التي تعتبر خطراً كبيرا يتهدد الصحة العامة .

قام **بينيدوس وزملاءه** (**Beneduce *et al* 2008**) طيلة فترة 4 أشهر، بجمع عينات من اللحوم البقرية الطازجة (100 عينة) من أماكن بيعها في المغرب وذلك من خمس مدن

مختلفة وكشفوا فيها عن الإشْريكِيَّة القولونِيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157. وتم عزل 9 ذراري O157 (9%) من 7 متاجر من أصل 15 متجر تم جمع العينات منها. وبينت النتائج وجود ذريتين إيجابيتين لامتلاكهما الـ *vt* (بشكل عام)، كما كانت هناك ذريتين إيجابيتين للـ *eae*، في حين أعطت خمس ذراري نتيجة سالبة لامتلاكها كل من الـ *vt* و *eae*.

وفي دراسة للكشف الإشْريكِيَّة القولونِيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في الحيوانات المعدة للذبح في بنغلاديش، قام **إسلام وزملاءه** (**Islam *et al*., 2008**) بجمع عينات روث من مستقيم الحيوانات (أبقار، جواميس، ماعز) واختبارها لوجود الإشْريكِيَّة القولونِيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو. وكانت نسبة انتشار الـ VTEC: 82.2%، 72.7%، 20.8% في روث الجواميس والأبقار والماعز على التوالي. في حين كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157: 14.4%، 7.2%،9.1% في روث الجواميس والأبقار والماعز على التوالي. وكانت 93% من ذراري الـ VTEC O157 إيجابية لامتلاكها الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-2 باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد، في حين كان الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 هو السائد في ذراري الـ VTEC Non-O157.

في دراسة لمعرفة نسبة انتشار الإشْريكِيَّة القولونِيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في مسالخ الأبقار بالبرازيل، قام **ريجوبيلو وزملاءه** (**Rigobelo *et al*., 2008**) بجمع عينات من ذبائح الأبقار (بعد نزع الأحشاء) واختبارها لوجود الإشْريكِيَّة القولونِيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو، وكانت نسبة انتشار الـ VTEC 1.4% في العينات المفحوصة، ولم تكن أي من الذراري المعزولة تنتمي للنمط المصلي O157 (0%). وأشار الباحثون في هذه الدراسة إلى أن أعلى نسبة انتشار للجرثومة كانت في العينات التي تم جمعها خلال موسم الأمطار.

كشف **كوبولد وزملاءه** (**Cobbold *et al*., 2008**) عن الإشْريكِيَّة القولونِيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في الحليب الطازج ولحوم الأبقار في الولايات المتحدة الأمريكية. وكانت نسبة انتشار الجرثومة بالاعتماد على نتائج الكشف عن الجينات المُشفِّرة للذيفانات

السامة لخلايا فيرو (*vt1,vt2*): 36% في لحوم الأبقار الطازجة، 23% في ذبائح الأبقار، 21% في الحليب الخام. واختلف توزع نوع الذيفان السام لخلايا فيرو بين الذراري المعزولة حسب نوع العينة، مع الإشارة إلى أن *vt1* كان سائداً في الذراري المعزولة من الحليب، *vt2* في الذراري المعزولة من ذبائح الأبقار، وكلا الذيفانين(*vt1&vt2*) في الذراري المعزولة من لحوم الأبقار. وأظهرت المقارنة ارتباطاً وثيقاً بين الذراري المعزولة في هذه الدراسة وتلك المعزولة سابقاً من روث الأبقار ومن حالات شديدة بمتلازمة انحلال الدم اليوريمية. وتثبت هذه الدراسة أن الإشْريكيَّة القولونيَّة VTEC Non-O157 موجودة في السلسلة الغذائية شمال غرب المحيط الهادي، وتشكل خطراً على الصحة العامة.

وفي أول مسح وبائي من نوعه في إيران، فحص **شيكارفوروش وزملاءه** (**Shekarforoush *et al.*, 2008**) ذبائح الأغنام في المسالخ لتقييم نسبة انتشار الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157:H7. ووجدوا أن نسبة انتشار الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157:H7 3.92% في العينات المفحوصة. وأشاروا إلى أن عزل الجرثومة كان أكثر تكراراً في الحيوانات الصغيرة منها في الكبيرة وأن ذلك يعود للاختلاف في تركيب النبيت Flora المعوي والناتج أساساً عن اختلاف العليقة بين الحيوانات. كما وجدوا تأثيراً كبيرا لفصول السنة على نسبة انتشار الجرثومة، حيث كانت النسبة أعلى في الفصول الحارة.

في الأردن، قام **طراونة وزملاءه** (**Tarawneh *et al.*, 2009**) بالتقصي عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في الأغنام والماعز، حيث بينت النتائج أن ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC تشكل 6.4% و21% من ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة من المسالخ ومحلات الجزارين على التوالي، وكانت 95% من ذراري الـ VTEC المعزولة تملك الجين المولد للذيفان السام لخلايا فيرو-1. وعند إجراء التنميط المصلي لذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو المعزولة كانت جميعها تنتمي للـ VTEC Non-O157، باستثناء ذريتين كانتا من الزمرة المصلية VTEC O157.

وفي دراسة نظرية أجراها روديس وزملاءه (**Rhoades *et al.*, 2009**)، لمعرفة نسبة انتشار الإِشْرِيكِيَّة القولونِيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157:H7 في الأبقار، وذلك من الحظيرة حتى طاولة المستهلك Farm-To-Table، أشاروا إلى التباين الكبير لنسبة انتشار الـ VTEC O157:H7 بين الأبحاث، وأشاروا إلى أن متوسط نسبة انتشارها كانت كالتالي : في الروث 6.2% (من 0% وحتى 57%)، في الجلود 44% (من 7.3% وحتى 76%)، في ذبائح الأبقار بعد نزع الأحشاء 0.3% (من 0% وحتى 0.5%) وفي منتجات اللحوم المعدة للاستهلاك 1.2% (من 1% وحتى 17%). وأشاروا إلى التأثير الكبير للموسم على نسبة انتشارها، حيث ترتفع النسبة بشكل ملحوظ خلال الأشهر الحارة من السنة. كما أشاروا إلى تأثير العمر حيث كانت نسبة انتشارها في الحيوانات الكبيرة أعلى من الحيوانات الصغيرة.

3- المواد وطرائق البحث

Material And Methods

3-1- المواد:

3-1-1- العينات:

3-1-1-1- عينات الذبائح (الأبقار، الأغنام ، الماعز)

تم جمع 110 عينة من ذبائح الأبقار والأغنام لكل منهما و 100 عينة من ذبائح الماعز بعد نزع الأحشاء، وذلك من المسالخ البلدية في كل من محافظة حماه ومنطقة السلمية، وكان يتم أخذ العينة من أماكن مختلفة من الذبيحة وبخاصة منطقة الفخذ والمتنة (جدار التجويف البطني) وكذلك من منطقة الرقبة.

3-1-1-2-عينات الحليب والجبن (أغنام وأبقار):

جمعت 50 عينة حليب أغنام وأبقار لكل منهما و50 جبن عكاوي أغنام وأبقار لكل منهما، وذلك من أماكن بيعها في منطقة السلمية ومحافظة.

3-1-1-3- عينات شاورما الدجاج :

تم جمع 100 عينة شاورما دجاج نيئة، وذلك من مطاعم الوجبات السريعة في كل من محافظة دمشق وحماه ومنطقة السلمية.

3-1-1-4- عينات الهمبرغر :

تم جمع 50 قرص همبرغر نيئ؛ وذلك من أماكن بيع اللحوم في محافظة دمشق، ومن مطاعم الوجبات السريعة في كل من محافظة دمشق وحماه ومنطقة السلمية.

3-1-1-5- عينات روث الأبقار والأغنام :

تم جمع 40 عينة من روث كل من الأبقار والأغنام لكل منهما، وذلك من مزارع الأبقار في منطقة السلمية .

ويبين الجدول رقم 1 بيانات العينات المجموعة .

جدول رقم (1): مصادر وعدد العينات المجموعة.

نوع العينة	العدد المجموع من كل منطقة			حجم العينة
	محافظة حماه	منطقة السلمية	محافظة دمشق	
ذبائح أبقار	100	10	0	25 غ
ذبائح أغنام	100	10	0	25 غ
ذبائح ماعز	25	75	0	25 غ
حليب أغنام	0	50	0	10 مل
جبن أغنام	25	25	0	نصف قرص
حليب أبقار	0	50	0	10 مل
جبن أبقار	25	25	0	نصف قرص
شاورما دجاج	35	45	20	25 غ
همبرغر	5	30	15	قرص واحد
روث أبقار	0	40	0	10 غ
روث أغنام	0	40	0	10 غ
المجموع الكلي للعينات	750 عينة			

3-1-2- المواد المستخدمة في العزل والتصنيف الجرثومي :

3-1-2-1- وسط مرق الصويا المغذية *Trypticase-Soy Broth*:

تم تحضيره بتذويب 30 غ من وسط مرق الصويا المغذية **(Merck lot : 1.05459.500)** في 1 لتر ماء مقطّر ضمن حوجلة معقمة في حمامّ مائي بدرجة الغليان وذلك حتى تمام الذوبان، ومن ثم صبه بمعدل 10 مل/أنبوب في أنابيب معقمة سعة 15 مل ضمن الحجرة المعقمة Safety Cabin واستخدمت سدادات قطنية لسد الأنابيب، تم بعدها تعقيمها بالموصدة Autoclave على الدرجة 121 مْ لمدة 15 دقيقة. وتم استخدام هذا الوسط لإكثار الجراثيم الموجودة في العينات.

3-1-2-2- وسط آغارُ ماكُونكِي بالسوربيتول المضاف إليه السيفكسيم وتيلُوريت البُوتاسيُوم *CT-Sorbitol-MacConkey Agar* :

تم تحضيره بتذويب 25.8 غ من وسط **آغارُ ماكُونكِي بالسوربيتول (Merck lot : 1.09207.500)** في 500 مل ماء مقطّر ضمن حوجلة معقمة في حمام مائي بدرجة الغليان حتى تمام الذوبان، ومن ثم تم إدخال الحوجلة للموصدة للتعقيم وذلك على الدرجة 121 مْ لمدة 15 دقيقة، وبعد إخراجها تمّ وضعها في حمام مائي بدرجة حرارة 50 مْ. بالتزامن مع ذلك تم حلّ أمبولة من **السيفكسيم وتيلُوريت البُوتاسيُوم (Merck lot : 1.09202)** بـــ 1 مل ماء مقطر معقم. وإضافتها لوسط آغارُ ماكُونكِي بالسوربيتول الذي أصبحت درجة حرارته 50 مْ.ومن ثم تمّ صب الوسط في الأطباق وترك ليتصلب في الحجرة المعقمة. وتم استخدام الوسط لتمييز الجراثيم غير المخمرة للسوربيتول والمتحملة للسيفكسيم وتيلُوريت البُوتاسيُوم. **(March & Ratnam, 1986)**.

3-1-2-3- وسط آغارُ ماكُونكِي *MacConkey Agar* :

تم استخدامه لعزل جراثيم الإشْرِيكِيَّةُ القولونيَّة. وتم تحضيره بتذويب 50 غ من وسط **آغارُ ماكُونكِي (Himedia Patch No : YDO68)** في 1 لتر ماء مقطر ضمن حوجلة معقمة في حمامّ مائي بدرجة الغليان حتى تمام الذوبان وتعقيمه بعد ذلك بالموصدة على الدرجة 121 مْ لمدة 15 دقيقة، من ثم ترك ليبرد قليلا وتم صبه في الأطباق ضمن الحجرة المعقمة وترك ليتصلب. حيث تظهر جراثيم الإشْرِيكِيَّةُ القولونيَّة على هذا المنبت كمستعمرات دائرية زهرية اللون وذلك نتيجة تخميرها لسكّر اللاكتوز.

3-1-2-4-وسط الآجار المغذي المائل:

تم تحضيره بتذويب 28 غ من وسط الآجار المغذي (**BIOlabzrt lot NUA 160407058**) في 1 لتر ماء مقطر ضمن حوجلة معقمة في حمامّ مائي بدرجة الغليان حتى تمام الذوبان. ومن ثم تم صب 7 مل من الوسط بأنابيب سعة 15 مل واستخدمت سدادات قطنية لسد الأنابيب، ومن ثم تم تعقيمها بالموصدة على الدرجة 121 مْ لمدة 15 دقيقة، تم بعدها وضع الأنابيب بشكل مائل وتركها لمدة ليلة كاملة حتى يتصلب الوسط. وتم استخدامه لحفظ الذراري الجرثومية المعزولة.

3-1-2-5-وسط الـ SIM:

3-1-2-6-وسط آجار ثلاثي السكر والحديد TSI:

3-1-2-7-سكاكر (سكروز- غلوكوز- لاكتوز) (Himedia).

3-1-2-8-مرق ماء الببتون: (Himedia)

3-1-2-9-وسط السترات وفق سايمون: (Himedia)

3-1-2-10- وسط أحمر الميثيل: MR.VP (Himedia)

3-1-2-11- وسط اليوريا: (Himedia)

3-1-2-12- كاشف الأوكسيداز: (Himedia)

3-1-2-13- كاشف كوفاكس: (Merck)

3-1-2-14- بيروكسيد الهيدروجين 3%.

3-1-2-15- كاشف أحمر الميثيل: تم استخدامه حسب تعليمات الشركة المصنعة (Himedia).

3-1-2-16- كاشف فوكس بروسكاور: محلول ألفانفتول مع هيدروكسد البوتاسيوم.

تم تحضير جميع المنابت السابقة حسب تعليمات الشركة المصنعة.

3-1-3- مواد الزرع الخلوي :

3-1-3-1- خلايا فيرو: (خلايا كلية القرد الإفريقي الأخضر) Vero Cell

تم الحصول على الخط الخلوي Cell Line لخلايا فيرو من قسم إنتاج اللقاحات-مديرية الصحة الحيوانية-دمشق. وتم استنباتها وحفظها حسب الطريقة الموصوفة من قبل سميث وسكوتلاند (**Smith and Scotland 1993**) .

3-1-3-2- مصل أجنة العجول Fetal Bovine Serum Qualified FBS :

تم الحصول عليه من شركة **GIBCO** البريطانية (**Cat.No. : 10437-O28**). وتم إضافته لبيئة الاحتياجات الأساسية MEM للحصول على تركيز نهائي للمصل 5%، وذلك لتحضير وسط النمو الخاص بخلايا فيرو .

3-1-3-3- التربسين (Trypsin 1:250) :

تم الحصول عليه من شركة **GIBCOBRl** البريطانية (**CAT.NO. : 27250-O18**) وتم استخدامه لتحضير محلول التربسين 2.5%، وذلك من أجل الفصل الأنزيمي للخلايا عن سطح أوعية الزرع الخلوي أثناء إجراء **تمريرات الخلايا Passage**. وذلك بحل 5 غ من بودرة التربسين في 200 مل من محلول دارئة الفوسفات الملحية PBS وتركه على الخلاط لمدة ليلة كاملة على الدرجة 4 مْ، بعدها تمّ تثفيل المحلول على 6000 rpm لمدة 20 دقيقة، لإزالة الرواسب الباقية، تمّ ترشيح المحلول بعدها عَبر مرشحات غشائية 0.45 μ للتعقيم، ووزّع بعدها على عبوات 50 مل حُفِظتْ على – 20 مْ حتى الاستخدام.

3-1-3-4- دارئة الفوسفات الملحية PBS:

تم الحصول عليها من شركة **Nissui** اليابانية (**CODE : 05913**)، وحُضِّرت بتذويب 9.6 غ من البودرة في 1 لتر ماء مقطر مرتين DW2، وتعقيم المحلول بعدها بالموصدة على الدرجة 121 مْ لمدة 15 دقيقة، وتم استخدام المحلول كدارئة أثناء التعامل مع الخلايا.

3-1-3-5- بيئة الاحتياجات الرئيسية Eagle's MEM :

تم الحصول عليها من شركة **Nissui** اليابانية (**Code. NO. 05900**)، وتم تحضيرها بتذويب 9.4 غ من الوسط في 1 لتر ماء مقطر مرتين DW2، وتعقيم المحلول بعدها في الموصدة على الدرجة 121 مْ لمدة 15 دقيقة، وتم استخدامها لتحضير وسط النمو الخاص بخلايا فيرو.

3-1-3-6- صادات حيوية : (PSK : Pencillin/Streptomycin/kanamycin)

تم استخدام الـــ بنسلين-ج (مليون وحدة دولية/عبوة) وتم الحصول عليه من شركة **Sigma** (**LOT : 10KO543**). وسلفات الستربتوميسين streptomycin-sulfate (1غ/عبوة) وتم الحصول عليه من شركة **Nissui** اليابانية (**code. No. 196-O8511**). كما تم استخدام كاناميسين (1غ/عبوة) وتم الحصول عليه من شركة **Sigma** (**Code. No. A-2411**)، وتم استخدام هذه الصادات من أجل الحفاظ على عقامة الوسط ومنع تلوثه والقضاء على الجراثيم والفطور في حال وجودها.

3-1-3-7- بيكربوناتُ الصُّوديوم: Sodium Bicarbonate

تم استخدامها لتحضير محلول بيكربونات الصوديوم 8% الذي استخدم في ما بعد في ضبط درجة باهاء *pH* وسط النمو والحفظ. وذلك بتذويب 16 غ من بودرة بيكربونات الصوديوم في 200 مل ماء مقطر مرتين DW2، وتحريكه حتى تمام الذوبان، ثم تعقيمه في الموصدة على الدرجة 115 مْ لمدة 15 دقيقة .

3-1-3-8- البوليمكسين-ب :

استخدم بتركيز 0.1 ملغ/مل محلول دارئة الفوسفات الملحية واستخدم من أجل تحرير الذيفان السام لخلايا فيرو المرتبط بجراثيم الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو.

3-1-3-9- لــ-غلوتامين L-Glutamine:

تم الحصول عليه من شركة **Nissui** اليابانية (**code. No. O5988**)، وتم تحضيره بحل العبوة في 10 مل ماء مقطر مرتين ومعقم ثم إضافتها لـــ 1 لتر من بيئة الاحتياجات الأساسية. وذلك كمادة أساسية لنمو الخلايا.

3-1-3-10- وسط مرق الصويا المغذية :

استخدم لتنمية ذراري الإشريكية القولونية المعزولة قبل إجراء اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو.

3-1-3-11- أطباق مسطحة القعر 48 حفرة 48-flat-well with lid :

تم الحصول عليها من شركة **IwaKi** (**Code .No 3820-O24**) وتم استخدامها لتنمية الخلايا حتى تمام تشكل الطبقة الخلوية واختبار مقدرة ذراري الإشريكية القولونية على إنتاج الذيفان السام لخلايا فيرو على هذه الخلايا.

3-1-4- الكواشف و الكيماويات المستخدمة في تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد:

3-1-4-1- المَشْرّعات PRIMERS :

تم انتقاء تسلسل هذه المَشْرّعات من أجل تضخيم Amplification الجينات المشفرة لكل من الذيفان السام لخلايا فيرو-1 ***vt1*** والذيفان السام لخلايا فيرو-2 ***vt2*** (**OIE, 2008**).

تم استخدام زوجين من المشرعات ويبين الجدول رقم 2 بياناتها.

الجدول رقم (2): تسلسل المشرعات المستخدمة وحجم نواتج تفاعل

اختبار البوليميراز المتسلسل المتعدد.

Target Gene	Primer sequence 5'-3'	Amplicon size (bp)
vt1	F (5'-CGC-TCT-GCA-ATA-GGT-ACT-CC-3') R (5'-CGC-TGT-TGT-ACC-TGG-AAA-GG-3')	256
vt2	F (5'-TCC-ATG-ACA-ACG-GAC-AGC-AG-3') R (5'-GC-TTC-TGC-TGT-GAC-AGT-GAC-3')	185

3-1-4-2- عتيدة تفاعل البوليميراز المتسلسل ***TaKaRa Ex Taq***^{TM} :

تم الحصول عليها من شركة تاكارا-اليابان (**Code NO. RR01AM**) وتحوي هذه العتيدة على أنزيم بلمرة الدنا (***TaKaRa* Ex *Taq***^{TM})، والدارئة النوعية لتفاعل البوليميراز (10X Ex *Taq*^{TM} Buffer Mg^{2+} free) وملح كلوريد المَغْنيزيُوم (25 mM $MgCl_2$) ومزيج من القواعد الآزوتية الأربعة (dNTP : A/C/G/T).

3-1-4-3- معلم الوزن الجزيئي **100bp DNA Molecular Weight Marker**:

تم الحصول عليه من شركة *TaKaRa* اليابانية (**Code .No 3404A**)، وتم استخدامه من أجل معرفة الوزن الجزيئي لمنتجات التفاعل Amplicon.

3-1-4-4- مرق لوريا وبيرتاني **Luria-Bertani broth (pH:7)**:

تم تحضير هذا الوسط بتذويب 10 غ من التريبتون باكتو و5 غ من خلاصة الخميرة و10 غ ملح طعام في 1 لتر ماء مقطر، عُقِّم المحلول الناتج بعدها في الموصدة على الدرجة 121 مْ لمدة 15 دقيقة

ثمَّ تم صبُه في الأنابيب بمعدل 5مل /أنبوب. واستخدم هذا الوسط لتنمية الذراري الجرثومية المَعزولة من أجل تحضير مِرْصاف الحَمْضُ الرِّيْبِيُّ النَّوَوِي المَنْزُوع الأوكسجين DNA-template منها وذلك من أجل تضخيمها في اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.

3-1-4-5- ماء مقطر معقم خال من الـ Water-Free-DNA :

تم استخدامه في مرحلة استخلاص الـ DNA DNA-Extraction وفي مرحلة تحضير مزيج التفاعل.

3-1-4-6- آغاروز :

حصل عليه من شركة universal *PeqGold* (lot NO. 2) واستخدم لتحضير هلامة الآغاروز 2% من أجل الكشف عن نواتج التفاعل التي تم تضخيمها في تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد بالرَّحَلاَنّ الكَهْرَبِيّ Electrophoresis.

3-1-4-7- دارئة Tris-Borate-EDTA TBE (TBE-1X) :

حصل عليها من شركة تاكارا-اليابان (Code: T905) وتم تحضيرها بإذابة ظرف منها في 1 لتر ماء مقطر مرتين حتى تمام الذوبان (على الخلاط الحراري المغناطيسي). وتم استخدامها لتحضير هلامة الأغاروز وكدارئة للرّحَلاَنّ الكَهْرَبِيّ أثناء عملية الترحيل.

3-1-4-8- صبغة الإيثيديوم بروميد Ethidium Bromide :

حصل عليها من شركة تاكارا اليابانية وتم استخدامها للكشف عن نواتج التفاعل Amplicon. وذلك بإضافتها بتركيز 1 ميكروغرام/مل لهلامة الآغاروز أثناء تحضيرها، وكذلك إضافتها بتركيز 1 ميكروغرام/مل لدارئة الرحلان الكَهْرَبِيّ قبل إجراء عملية الترحيل، حيث أنها ترتبط مع الـ DNA الناتج عن التضخيم، وتتألق عند تعريض الهلامة للأشعة فوق البنفسجية ما يمكن من الكشف عن هذه النواتج.

3-1-4-9- دارئة التَحْميل Loading Buffer 6X :

تم الحصول عليه من شركة *TaKaRa* اليابانية (Code .No 1078A)، وتم إضافة 2 ميكرولتر منها إلى 10 ميكرولتر من الناتج النهائي لتفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد، وذلك قبل وضعه مباشرة في الحفرة المخصصة له في هلامة الآغاروز لإجراء الترحيل الكهربائي .

3-1-4-10- زيت معدني Mineral Oil :

تم الحصول عليه من شركة سيغما، وتمت إضافته بعد وضع مزيج التفاعل الجاهز في الأنابيب، وذلك منعاً لتبخر مزيج التفاعل أثناء عملية التدوير الحراري.

3-1-4-11- الأجهزة المستخدمة :

خلاط مغناطيسي (Advantec SR350)، جهاز ضبط الباهاء (TOA pH Meter)، حجيرة معقمة (HERolaB)، مثقلة عالية السرعة (SpectraFuge 240 LabNet). هيت بلوكر (VorTemp-56 LabNet). المدور الحراري (TechNE TC-512). قارئ الأشعة فوق البنفسجية موصول لكاميرا وكمبيوتر وطابعة (UVIPRO Platinum + MitsuBishi P93D). جهاز رحلان كَهْرَبِيّ (PeQlab BioTechnology GMbh).

3-1-5- الأوساط و المواد اللازمة لإجراء اختبار التراص بالأنابيب :

3-1-5-1- المَصْل الضِدِّيّ Antiserum لكل من المستضد الجسدي O157 (Difco^{TM} Cat.No.: 229701) والمستضد السوطي H7 (Difco^{TM} Cat.No. : 221591) :

تم الحصول عليها من شركة BD-difco، وتم استخدامها للكشف عن وجود الإشْرِيكِيَّةُ القولونيَّة O157:H7، في الذراري الجرثومية .

3-1-5-2- فورمالين:

تم استخدامه من أجل قتل الجراثيم .

3-1-5-3- محلول مِلْحِيّ معقم: 0.85 sterile NaCl solution %

تم تحضيره بإذابة 5.8 غ ملح طعام، في 1000 مل ماء مقطر، وتعقيمه في الموصدة على الدرجة 121 مْ لمدة 15 دقيقة.

3-1-5-4- الذراري الجرثومية:

والتي تم تصنيفها سابقا على أنها *E.Coli*

3-1-5-5- أنابيب ماكفرلاند McFarland Barium sulfate standard :

تم استخدامها لمعايرة الأنابيب من أجل الحصول على كفاءة جرثومية موافقة لأنبوب ماكفرلاند رقم 3 حسب تعليمات الشركة المصنعة .

3-2- طرائق البحث :

3-2-1- جمع العينات :

3-2-1-1- عينات الذبائح (أبقار، أغنام، ماعز):

جمعت هذه العينات بشكل عشوائي من المسالخ البلدية الموجودة في كل من محافظة حماه ومنطقة السلمية، وذلك في الفترة الواقعة بين 2007/11 و2008/4 بمعدل 25 غ من كل ذبيحة، وتم جمع العينات من مناطق مختلفة في الذبيحة (بطن، فخذ) ووضعها في أكياس نايلون معقمة منفصلة ومحكمة الإغلاق، قبل وضعها في صندوق العينات، وذلك لضمان عدم حدوث تلوث تصالبي *Cross-Contamination*، وتم وضع حوافظ ثلجية في الصندوق لضمان بقاء درجة الحرارة مناسبة لحفظ العينات (4 – 8 مْ)، حتى وصولها إلى مخبر قسم الأحياء الدقيقة في كلية الطب البيطري-حماه، حيث أجريت عليها خطوات الزرع والاستنبات. (**Arthur *et al.*, 2002**)

3-2-1-2- عينات الشاورما والهمبرغر :

جمعت عينات الشاورما النيئة (بمعدل 10 غ من السيخ المعد للشيّ) وأقراص الهمبرغر (قرص واحد من الوجبة) بشكل عشوائي من محلات الباعة ومطاعم الوجبات السريعة في كل من منطقة السلمية ومحافظتي حماه ودمشق في الفترة الواقعة بين 2007/11 و2008/4. كما تم جمع أقراص الهمبرغر أيضا من أماكن بيع اللحوم في محافظة دمشق (منطقة سوق ساروجا) في 2008/2، وتم ذلك أيضاً باستخدام أكياس نايلون معقمة ومحكمة الإغلاق، مع مراعاة وضع حوافظ ثلجية ضمن الصندوق أيضا لضمان درجة حرارة (4 – 8 مْ)، وتم نقلها فوراً إلى مخبر قسم الأحياء الدقيقة في كلية الطب البيطري-حماه، لإجراء خطوات الإكثار والزرع الجرثومي عليها. (**Lukásová *et al.*, 2004**)

3-2-1-3- عينات الحليب والجبن :

جمعت عينات أقراص الجبن العكاوي (غنم وبقر، بمعدل نصف قرص من الوجبة) وعينات الحليب (بقر،غنم، بمعدل 10 مل) بشكل عشوائي من أماكن بيعها في كل من منطقة السلمية ومحافظة حماه، في الفترة الواقعة بين 2007/11 و2008/4، وذلك باستخدام أكياس نايلون

معقمة لأقراص الجبن، وأنابيب بلاستيكية معقمة محكمة الإغلاق لعينات الحليب، مع التركيز على الحوافظ الثلجية في صندوق العينات، وتم نقلها فورا إلى مخبر قسم الأحياء الدقيقة في كلية الطب البيطري-حماه لإجراء خطوات الإكثار والزرع الجرثومي عليها. (**Pradel *et al.*, 2000**)

3-2-1-4- عينات البراز:

تم جمع عينات البراز من الأبقار والأغنام السليمة ظاهرياً بشكل عشوائي من قطعان الأغنام وأماكن تربية الأبقار في منطقة السلمية في الفترة الواقعة بين 2007/11 و2008/4. وذلك من المستقيم مباشرة باستخدام كفوف بلاستيكية خاصة، وتم وضعها في أكياس نايلون معقمة ومحكمة الإغلاق. ووضعها في صندوق العينات الذي يحوي على الحوافظ الثلجية. وتم نقلها بأسرع ما يمكن إلى مخبر قسم الأحياء الدقيقة في كلية الطب البيطري-حماه لإجراء خطوات الإكثار والزرع الجرثومي عليها. (**Beutin *et al.*, 1993**)

3-2-2- العزل والتصنيف الجرثومي :

3-2-2-1- الإكثار على مرق الصويا المغذية :

تم إكثار جميع العينات على وسط مرق الصويا المغذية وذلك بهدف تنمية جراثيم الإشْريكيّة القولونيّة قبل زرعها على الأوساط الصلبة الانتقائية، واختلفت مدة ودرجة حرارة التحضين حسب نوع العينة، حيث تم إكثار عينات اللحوم والشاورما والهمبرغر على الدرجة 41-42 مْ لمدة 6 ساعات، في حين تم إكثار عينات الجبن والحليب على الدرجة 41-42 مْ لمدة 24 ساعة، أما عينات البراز فقد تم إكثارها على الدرجة 37 مْ لمدة 6 ساعات فقط وذلك للتخفيف من نمو الجراثيم الأخرى. (**OIE, 2008**)

3-2-2-2- الزرع على وسط آغارْ ماكُونكي ووسط آغارُ ماكُونكي بالسوربيتول :

تم نقل ملء عروة زرع بكتيري من مرق الصويا المغذية، المحضّنة سابقاً، وزرعها على كل من **وسط آغارُ ماكُونكي** كوسط انتقائي لنمو الإشْريكيّة القولونيّة بشكل عام حيث تظهر مستعمراتها على هذا المنبت بلون زهري ناتج عن قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز وتشكيل حمض يغير لون الكاشف الموجود فيه وهو أحمر المتعادل، **ووسط آغارُ ماكُونكي**

بالسوربيتول المضاف إليه السيفكسيم وتيلُّوريت البُوتاسْيُوم كوسط انتقائي لنمو الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو بشكل عام، والـ VTEC O157:H7 بشكل خاص، حيث تتميز هذه الأخيرة بعدم مقدرة أغلبية ذراريها على تخمير سكر السوربيتول أو التخمير البطيء جدا له فتظهر عليه بشكل مستعمرات شفافة رمادية أو شاحبة، كما أنها متحملة **للسيفكسيم وتيلُّوريت البُوتاسْيُوم** اللذان يملكان تأثيراً مثبطاً لنمو كل من الغازيَّة *Aeromonas*، القَوْزَبيَّة *Plesiomonas*، المُورْغانيلَّة *Morganella*، والبرُوفيدنْسيَّة *Providencia*. وتم تحضين الأوساط المزروعة بالدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة. بعدها تم أخذ المستعمرات النقية المميزة للمسبب من كلا الوسطين (مع الإشارة لأنه تم إعادة زرع بعض المستعمرات على كلا المنبتين وذلك بهدف الحصول على عزولات نقية)، وتم تنميتها على وسط الآجار المغذي المائل (الذي تم استخدامه كوسط لحفظ الذراري الجرثومية) بالدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة بعدها تم نقل أنابيب الآجار المائل ضمن أكياس نايلون محكمة الإغلاق ووضعها في البراد على الدرجة 4 مْ. **(Zadik *et al.*, 1993)**

3-2-3- التصنيف البيوكيميائي لذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة:

وتم إجرائها حسب **كوينن وزملاءه (Quinn *et al.*, 1999)** كما يلي :

3-2-3-1- وسط آجار ثلاثي السكر بالحديد Triple Sugar Iron Agar (TSI) :

تم زرع الذراري الجرثومية فيه باستخدام العروة الناخزة، وتحضينها لمدة 24 ساعة على الدرجة 37 مْ. حيث تُخمِّر الإشْريكيَّة القولونيَّة السكاكر الثلاث: الغلوكوز واللاكتوز والسكروز الموجودة في الوسط، ويصبح الوسط حامضياً ويتغير لون كاشف أحمر الفينول إلى أصفر، فيصبح لون الجزء القائم والمائل من المنبت أصفر اللون.

3-2-3-2- اختِبارُ الكاتالاَز *Catalase Test* (الخميرة المرجعة):

يمكن هذا الاختبار من الكشف عن امتلاك ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة لأنزيم الكاتالاز الذي يحول بيروكسيدُ الهيدْروجين إلى ماء وأوكسجين. وتم إجراء الاختبار بوضع مستعمرة جرثومية على شريحة زجاجية، ثم تمت إضافة قطرة من الماء الأوكسجيني (بيروكسيدُ الهيدْروجين) H_2O_2 3% إليها، حيث تظهر المستعمرات الإيجابية فوران فقاعات غازية في غضون ثوان عديدة.

3-2-3-3- اختِبارُ الأكسيداز *Oxidase Test* :

يكشف الاختبار عن أنزيم أُكْسيداز السِّيتُوكرُوم في الذراري الجرثومية التي تمتلكه، وتم إجراء هذا الاختبار باستخدام أقراص ورقية مشبعة بـ 1% من محلول Tetramethyl-P-Phenylene Diamine Dihydro Chloride موضوعة في طبق بيتري معقم، تم نقل جزء من مستعمرة فتية مختبرة إلى سطح القرص الورقي حيث يشير ظهور اللون البنفسجي خلال 10ثواني إلى التفاعل الإيجابي. والإِشْريكِيَّة القولونيَّة مثل بقية الأمعائيات سالبة لهذا الاختبار.

3-2-3-4- وسط الـ *SIM* :

استخدم هذا الوسط للكشف عن مقدرة الجراثيم على الحركة.

3-2-3-5- اختبار السترات :

استخدم وسط السترات لسايمون *Simmon's Citrate* الذي يحوي على كاشف *Bromo thymol blue* للتعرف على الجراثيم التي تستخدم سترات الصوديوم. حيث تم صب الوسط في أنابيب 10 مل بشكل مائل وتحضين الذراري الجرثومية عليه لمدة 24 ساعة على الدرجة 37 مْ، حيث يدلُّ تحول الوسط من اللون الأخضر إلى الأزرق على النتيجة الايجابية، وفي حال الإِشْريكِيَّة القولونيَّة يبقى لون المنبت دون تغير بسبب أنها لم تستخدم سترات الصوديوم أي أنها سلبية لهذا الاختبار.

3-2-3-6- اختبار اليوريا:

استخدم هذا الاختبار للكشف عن وجود خميرة اليُورياز Urease، حيث تحلل بعض الجراثيم اليوريا منتجة الأمونيا ما يؤدي لرفع درجة باهاء الوسط pH ويظهر اللون الوردي بالحالة الايجابية، حيث تم تحضير الوسط وحقن الذراري الجرثومية فيه وتحضينه لمدة 24 ساعة على الدرجة 37 مْ. ويبقى لون الوسط كما هو في حال الإِشْريكِيَّة القولونيَّة حيث أنها سلبية لهذا الاختبار.

3-2-3-7- اختبار أحمر الميثيل :MR/VP

تم تحضير وسط VP، وزرع الذراري الجرثومية عليه وتحضينها على الدرجة 37 مْ لمدة 72 ساعة، تم بعدها إضافة عدة قطرات من كاشف أحمر الميثِيل، حيث يتغير لون الوسط من اللون الأصفر إلى اللون الأحمر في الحالة الإيجابية والإِشْريكِيَّة القولونيَّة إيجابية لهذا الاختبار.

3-2-3-8- اختبار تخمير السكاكر (سكروز- لاكتوز- غلوكوز):

تم تحضير مرق ماء الببتون الذي يحوي على كاشف أندريد Andrade's indicator مع 1% سكر، وتم زرع المستعمرات الجرثومية عليه ثم التحضين لمدة 24 ساعة على الدرجة 37 مْ. حيث يعني تحول لون المرق إلى اللون الأحمر مقدرة الذراري على تخمير السكر الموجود. والإشْريكِيَّة القولونيَّة إيجابية لتخمير السكاكر الثلاث.

ويبين الجدول رقم 3 الاختبارات البيوكيميائية التي استخدمت لتصنيف الإشْريكِيَّة القولونيَّة.

الجدول رقم (3) : الاختبارات البيوكيميائية التي استخدمت لتصنيف الإشْريكِيَّة القولونيَّة

الأوكسيداز	الكاتالاز	اللاكتوز	السكروز	الغلوكوز	الحركة	اليوريا	السترات	أحمر الميثيل	الأندول	TSI	
−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	*Y/Y/-	*E.Coli*

* Y/Y/- : قعر أصفر – سطح أصفر – لا تطلق الـ H_2S

3-2-4- الزرع الخلوي :

يبقى اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو هو الطريقة القياسية (*Gold Standard*) لتأكيد إنتاج الجرثومة للذيفان السام لخلايا فيرو. وتنفرد خلايا فيرو بهذه الخاصية عن غيرها من الخطوط الخلوية نتيجة امتلاك الغِشاءُ البلازْمِيّ Plasma Membrane لخلاياها تركيزاً عالياً من غلوبو-تري-أسيل-سيراميد Globotriaosylceramide (GB_3) والغلوبو-تيترا-أسيل-سيراميد Globotetraosylceramide (GB_4) والتي تعد المستقبلات الرابطة للذيفان السام لخلايا فيرو بالسطح الخلوي. وتملك القدرة على ربط جميع أنماط ذيفان فيرو بجميع متغايراته. وإمكانية تطبيقه على طيف واسع من العينات حيث يمكن إجراء الاختبار باستعمال معلق برازي Faecal Suspension، الرشاحة المزرعية Culture Filtrates، أو المزارع الجرثومية الحية Live Cultures. كما يمكن الرفع من حساسية الاختبار بمعاملة الذراري الجرثومية بالبوليميكسين-ب Polymyxin-B لتحرير الذيفان السام لخلايا فيرو المرتبط بجدار الخلايا الجرثومية.

أجري الاختبار على جميع ذراري الإشريكية القولونية وذلك حسب **سميث وسكوتلاند** (**Smith and Scotland, 1993**) كما يلي:

3-2-4-1- تحضير خلاصة عصيات الإشْرِيكِيَّة القولونيَّة بالبوليمكسين-ب :

- حضنت مسحة من نمو وافر للإشريكية القولونية على **وسط آغارُ ماكُونكِي** في 20 مل من وسط مرق الصويا المغذية لمدة 5 ساعات وبدرجة 37 مْ وذلك على حضانة هزازة.
- نبذ المرق بسرعة 10000 × g، لمدة عشر دقائق وذلك لفصل الخلايا الجرثومية، ثم تم سكب السائل الطافي.
- أخذ الراسب الجرثومي وعلّق في 1 مل من دارئة الفوسفات الملحية المحتوية على 0.1 ملغ من المضاد الحيوي بولميكسين-ب، وتحضينه على الدرجة 37 مْ لمدة نصف ساعة وذلك لتحرير الذيفان السام لخلايا فيرو المرتبط بالجراثيم.

- بعد ذلك تم تثفيل المعلّق بسرعة 10000 × g لمدة عشر دقائق وتم أخذ السائل الطافي Supernatant وفحصه للتأكد من خلوه من الخلايا الجرثومية، وذلك بزرع عروة بكتيرية على وسط آغارُ ماكُونكِي.

3-2-4-2- تحضير المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو Monolayer Vero cell:

تم تحضير وسط النمو الخاص بخلايا فيرو كما يلي :

- 5% مصل أجنة عجول FBS.
- 1% L-glutamin.
- 1.5% محلول $NaHCO_3$ 8%.
- 1% محلول المضادات الحيوية (PSK).
- جميع المكونات السابقة محسوبة بالنسبة لـ 100 مل من وسط Eagle MEM.

3-2-4-3- تنمية خلايا فيرو للحصول على طبقة أحادية من الخلايا Monolayer Cell في الأطباق مسطحة القعر:

- في البداية تم إزالة الوسط القديم بالشفط Aspiration والإبانة Decantation من وعاء Flask الزرع الخلوي.
- تم بعد ذلك غسيل سطح الخلايا داخل الوعاء بـ 10 مل دارئة الفوسفات الملحية PBS، بعدها أزيل المحلول الدارئ، وتمت إعادة هذه الخطوة مرتان.
- تمت إضافة كمية من محلول التربسين 0.25%، كافية لتغطية سطح النمو الخلوي.
- تم تحضين وعاء الزرع الخلوي لمدة 5-10 دقائق في الدرجة 37 مْ، مع التربيت (النقر) الخفيف لوعاء الزرع براحة اليد.
- فُحِص وعاء الزرع الخلوي بالعين المجردة لملاحظة عكارة المعلق، وتحت المجهر المقلوب Inverted Microscope للتأكد من انفصال الخلايا عن السطح De-Attaching.
- أُضيف 10 مل من وسط النمو الجاهز GM وتم مزجه بلطف مع المعلق الخلوي باستخدام ميمَص Pipette حتى الامتزاج الكامل.

- نُقل المعلق الخلوي إلى زجاجة تحوي 30 مل من وسط النمو GM، وتم المزج بلطف بواسطة المِمَصّ Pipetting.
- نُقل 0.5 مل من المعلق الخلوي إلى حفر أطباق مسطحة القعر 48 حفرة.
- حُضنت الأطباق في الدرجة 37 مْ، وتمت مراقبتها بالمجهر المقلوب يوميا، حتى التأكد من تشكل طبقة أحادية ومتكاملة من الخلايا Monolayer Cell.

3-2-4-4- اختبار السمية لخلايا فيرو:

- تمت إضافة 50 ميكرولتر من مستخلص الإِشْريكيَّة القولونيَّة بالبوليمكسين-ب لكل عينة إلى حفرتين في الطبق الخلوي المحتوي على مزرعة ذات طبقة أحادية من خلايا فيرو(مكرر لكل عينة)، والتي تم تحضيرها في طبق الزرع الخلوي ذو الـ 48 حفرة. وذلك بدون تبديل بيئة الزرع الخلوي. وتُركت عدة حفر من كل طبق بدون إضافة كشاهد سلبي.

أعيدت الأطباق للحاضنة على الدرجة 37 مْ، مع فحصها يوميا باستخدام المجهر المقلوب Inverted Microscope وذلك للكشف عن التأثيرات المرضية Cytotoxic Effect المميزة للذيفان السام لخلايا فيرو على هذا النوع من الخلايا والتي تكون على شكل تدور للخلايا Rounded Up مع انكماشها shriveled، وانفصالها detached عن سطح المنبت.

3-2-4-5- قراءة النتائج:

تم تسجيل النتيجة النهائية للاختبار في اليوم الثالث، حيث اعتبرت أي عينة إيجابية في حال موت 50% من الخلايا على الأقل في الحفرة الواحدة.

3-2-5- اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد Multiplex-Polymerase Chain Reaction :

وهي تقنية مخبرية تمكننا من تضخيم *Amplification* سلسلة محددة من الحَمْضُ الرِّيْبِيُّ النَّوَوِي المَنْزُوع الأوكسِجين DNA، خاصة ونوعية وعالية الحفظ *Highly Conserved* تقع بين منطقتين متتابعتين من الحَمْضُ الرِّيْبِيُّ النَّوَوِي المَنْزُوع الأوكسِجين، ملايين المرات خلال ساعات قليلة. ابتكرها الدكتور غاري موليس *Dr.kary Mullis* 1983 ونال عليها جائزة نوبل للكيمياء بعد عشرة سنوات 1992. ومهدت لقيام ثورة حقيقية في علم الجينات وأبحاثها وخاصة في مجال تشخيص الأمراض الوراثية *Genetic Diseases Diagnosis*، الطب الشرعي *Forensic Medicine*، وانعكس صداها على الكيمياء الحيوية الجزيئية *Molecular Biology* بشكل عام.

تم استخدام هذه التقنية في البحث للكشف عن وجود الجينات المشفرة لكل من الذيفان السام لخلايا فيرو-1 *vt1* والذيفان السام لخلايا فيرو-2 *vt2*، واللذان يعتبران من أهم عوامل الضراوة التي تملكها الإِشْرِيكِيَّة القولونِيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو، والتي تسبب جميع تعقيدات المرض في البشر، حيث تم إخضاع جميع الذراري الجرثومية التي كانت إيجابية للإشريكية القولونية باختبارات العزل والتصنيف الجرثومي لهذا الاختبار لبيان امتلاكها لهذه الجينات.

تم الاختبار على ثلاث مراحل : **المرحلة الأولى** هي مرحلة **تحضير مِرْصاف الـ DNA الجرثومي DNA-Template** وتم فيها استخلاص الحَمْضُ الرِّيْبِيُّ النَّوَوِي المَنْزُوع الأوكسِجين من الذراري الجرثومية المعزولة بالطريقة التقليدية (الغلي). **المرحلة الثانية** وهي **مرحلة التضخيم** وهي الأساسية في الاختبار وقد تم استخدام تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد Multiplex-Polymerase Chain Reaction التي تمكن من تضخيم منطقتين متمايزتين من الحَمْضُ الرِّيْبِيُّ النَّوَوِي المَنْزُوع الأوكسِجين الخاص بالإِشْرِيكِيَّة القولونِيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو، وهذه المناطق خاصة بالـ vt_1 / vt_2، في نفس الوقت وبذلك يتم توفير الوقت والجهد والكيمياويات. المرحلة الثالثة تضمنت **الكشف عن نواتج**

التفاعل Amplicon وتم ذلك باستخدام تقنية الرَحَلاَنْ الكَهْرَبِيّ Electrophoresis في هلامة الآغاروز. **(OIE, 2008)**

3-2-5-1- تحضير قالب الـ DNA الجرثومي :

- في البداية تم إعادة زرع الذراري الجرثومية على وسط كليجلر.
- تم أخذ ملء عروة Loop زرع جرثومي من المستعمرات النامية وحلها في أنابيب تحوي 5 مل من وسط لوريا وبريتاني Luria-Bertani broth وتم تحضين الأنابيب لمدة ليلة كاملة على الدرجة 37 مْ.
- تم أخذ بواسطة مِمّصّ معقم 1 مل من الوسط النامي من كل عينة (بعد رج الأنبوب بشكل جيد حتى لا يتبقى أي راسب)، وتم نقلها لأنابيب إيندورف 1.5 مل. ومن ثم تم نقل الأنابيب إلى مكان تنفيذ الاختبار في مخبر الكيمياء الحديثة والبيولوجيا الجزيئية في كلية الطب البيطري-حماه.
- تم تثفيل الأنابيب أولاً على 10.000 rpm على الدرجة 4ْ لمدة 10 دقائق.
- تم استبعاد السائل الطافي، وتم وضع 200 *µl* ماء مقطر معقم في كل أنبوب.
- تم وضع الأنابيب في الـ Heat Blocker، على الدرجة 100 لمدة 15 دقيقة. بعدها نقلت الأنابيب فوراً ووضعت على الثلج.
- تم إعادة تثفيل الأنابيب على 13.000 دورة في الدقيقة، لمدة 10 دقائق. ثم تم نقل الأنابيب وحفظت على الـ - 20 مْ لحين العمل بها.

3-2-5-2- مرحلة التّضْخيم Amplification :

- تحضير مزيج التفاعل الأساسي Master Mix:

تم تحضير مزيج التفاعل من عتيدة تفاعل البوليميراز المتسلسل الخاصة بشركة تاكارا، وذلك حسب ما يوضحه الجدول رقم **4**. (الكميات خاصة بالعينة الواحدة)

الجدول رقم (4):مكونات مزيج تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد لكل عينة.

TaKaRa Ex taq™ (5unit/µl)	0.25 µl
10x *Ex taq*™ Buffer (Mg^{2+} free)	5 µl
Mgcl2	10 µl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 µl
Template DNA	2 µl
Primer *vt1* A	0.2 µl
Primer *vt1* B	0.2 µl
Primer *vt2* A	0.2 µl
Primer *vt2* B	0.2 µl
ماء معقم مقطر خال من الحمض النووي	Up to 50 µl

- تم نقل الأنابيب بعدها إلى جهاز التدوير الحراري Thermo-cycler الذي تمت برمجته مسبقا، حسب ما يوضحه الجدول رقم 5.

الجدول رقم (5): برنامج التدوير الحراري

المرحلة	درجة الحرارة	المدة	عدد الدورات
Initial Denaturation	94 م	2 دقيقة	1 دورة
Denaturation	94 م	1 دقيقة	30 دورة
Annealing	62 م	1.5 دقيقة	
Extension	72 م	2 دقيقة	
Final-Extension	72 م	5 دقائق	1 دورة

- تم نقل الأنابيب بعدها ووضعها على الدرجة -20 لحين العمل بها.

3-2-5-3- مرحلة الكشف عن نواتج التفاعل Amplicons :

بعد إتمام تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد تم فحص نواتج التفاعل للكشف عن النواتج النوعية وذلك باستخدام تقنية الرَحَلاَنْ الكَهْرَبِيّ في هلامة الآغاروز وذلك حسب ما يلي :

- أذيب 2 غ من الآغاروز في 100 مل من دارئة الـــ TBE في جهاز المَوْجَات المِكْرَوِيَّة Microwave، برد بعدها إلى الدرجة 60 مْ، أضيفت صبغة الــ EB في هذه الأثناء تم تحضير قالب صب الآغاروز ووضع المشط الخاص بصناعة الحفر في هلامة الآغاروز.
- سكب الآغاروز في قالب الصب للحصول على هلامة آغاروز بسماكة 3-5 مل وترك حتى يتصلب الآغاروز وعند التأكد من تصلب الآغاروز نزع المشط برفق ووضعت الهلامة في وعاء الرَحَلاَنْ الكَهْرَبِيّ وغمرت بدارئة الـــ TBE المضاف لها الـــ EB.
- تم بعدها وضع 5 µl من معلم الوزن الجزيئي 100 bp في الحفرة الأولى من الهلامة، بعد ذلك وضع 10 µl من نواتج التفاعل التي تم مزجها مع 2 µl من دارئة التحميل Loading Buffer ووضعها في حفر هلامة الأغاروز بالترتيب. مع تضمين كل قالب هلامة لشاهد سلبي (كافة مكونات التفاعل بدون قالب الـــ DNA حيث تم إضافة ماء مقطر خالي من الـــ DNA بدلا منه).
- وضع غطاء جهاز الرحلان ووصلت أقطاب الجهاز إلى مزود الطاقة واستخدم فولتاج ثابت (100 فولت) من أجل إجراء الرحلان وتم الانتظار حتى وصول صبغة بروم فينول الأزرق إلى نصف المسار الطولي في هلامة الآغاروز، إي حوالي ساعة واحدة.
- تم فصل التيار الكهربائي وأزيلت أقطاب الجهاز وفحصت هلامة الآغاروز على جهاز يصدر الأشعة فوق البنفسجية (ترتبط صبغة الإيثيديوم بروميد بسلاسل الـــ DNA وعندما تتعرض للأشعة فوق البنفسجية تصدر لمعاناً) من أجل وجود أنطقة Bands الـــ DNA في الأمكنة المحددة (256 و185 قاعدة آزوتية) وذلك بالمقارنة مع معلم الوزن الجزيئي العياري.

- تمت قراءة النتائج باعتبار نواتج الـ PCR ذات الحجم 256 قاعدة آزوتية على أنها إيجابية لوجود الـ vt_1 والنواتج ذات الحجم 185 قاعدة آزوتية على أنها إيجابية لوجود الـ vt_2.
- في النهاية تم تصوير هلامة الآغاروز باستخدام نظام كاميرا مجهز بفلتر خاص يسمح بالتصوير بوجود الأشعة فوق البنفسجية النافذة، وتمت طباعة الصور على طابعة موصولة بالكمبيوتر.

3-2-6- اختبار التراص في الأنابيب :

تم تنفيذ هذا الاختبار على جميع الذراري الجرثومية التي كانت إيجابية لامتلاك أحد الجينات المرمزة للذيفان (*vt2* , *vt1*) أو كليهما في اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد، بهدف معرفة ما إذا كانت الذرية تنتمي للنمط المصلي O157:H7، وتم إجراء الاختبار حسب تعليمات الشركة المصنعة **للمَصْلّ الضِدِّيّ BD Difco™**، ويعتمد اختبار الـــ O157 على التراص في الأنابيب لمعايرة Titration وجود المستضد الجسدي O. في حين يعتمد اختبار الـــ H7 على التراص في الأنابيب للكشف Detection عن المستضد الهدبي H. أما مبدأ الاختبار فيقوم على التفاعل بين المَصْلّ الضِدِّيّ النوعي والمُستَضِدّ المطابق له Homologous. **(Chapman, 1989)**

3-2-6-1- اختبار التراص في الأنابيب لمعايرة المُستَضِدّ الجسدي O157 :

- تم إعادة زرع ذراري الإشْرِيكيَّة القولونيَّة على وسط الآغار المغذي المائل.
- تم أخذ مسحة وافرة من المستعمرات النامية على الوسط السابق وحلها في أنابيب تحوي على المحلول المِلْحِيّ Saline 0.85% وذلك حتى الحصول على معلق متجانس.
- تم وضع الأنابيب سابقة الذكر في حمام مائي بدرجة الغليان لمدة 60 دقيقة. وتم بعدها استبعاد أي أنبوب حصل فيه أي ترسيب للجراثيم (حيث يجب أن يحافظ المعلق على التجانس).
- ترك المعلق ليبرد، ثم أضيف إليه بعدها المحلول المِلْحِيّ للحصول على كثافة مساوية تقريبا لأنبوب ماكفرلاند رقم 3.
- أضيف الفورمالين بنسبة 0.5% للحجم النهائي للقضاء على الجراثيم.
- تم تحضير 8 أنابيب لكل عينة في صف أنابيب Rack.
- بواسطة ممصّ Pipette أضيف 0.9 مل من المحلول الملحي للأنبوب الأول، و0.5 مل لبقية الأنابيب.
- تم تمديد المَصْلّ الضِدِّيّ للـــ O157. حيث تمت إضافة 0.1 مل منه للأنبوب الأول من كل صف مع المزج بشكل جيد، نُقِل بعدها 0.5 مل من الأنبوب

الأول للأنبوب الثاني مع المزج، واستمرت هذه العملية حتى الأنبوب السابع حيث تم المزج وإتلاف الـ 0.5 الناتجة. حيث تم ترك الأنبوب الثامن كشاهد سالب يحوي فقط على المحلول الملحي.

- أضيف 0.5 مل من المعلق الجرثومي لكل من الأنابيب الثمانية.
- تم بعدها رجّ صف الأنابيب بلطف، وحُضّنت على الدرجة 50 مْ لمدة 18-24 ساعة.
- تم قراءة التراص في الأنابيب.

3-2-6-2- اختبار التراص في الأنابيب للكشف عن المُستَضِدّ الهدبي H7:

- تم إعادة زرع ذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة على وسط الآغار المغذي المائل.
- تم حل المستعمرات النامية على الوسط السابق في أنابيب تحوي على المحلول المِلْحِيّ Saline 0.85% وذلك حتى الحصول على معلق مُتجانس.
- تم القضاء على الجراثيم بإضافة الفورمالين للحجم النهائي بتركيز 0.3%، ضبطت بعدها الكثافة بحيث طابقت أنبوب ماكفرلاند رقم 3.
- مُدِّدَ المَصْلّ الضِدِّيّ لـ H7 بنسبة 1:500 وذلك بإضافة 0.2 مل من المصل المُحلّ لـ 49.8 مل من المحلول الملحي saline 0.85%.
- أُضيف 0.5 مل من المحلول الملحي للمَصْلّ الضِدِّيّ إلى كل أنبوب في الصف.
- أُضيف 0.5 مل من المعلق الجرثومي المعطل لكل ذرية إلى أنبوب في الصف.
- حُضّنت الأنابيب في الدرجة 50 مْ لمدة ساعة واحدة يتم بعدها قراءة نتيجة التراص في الأنابيب.

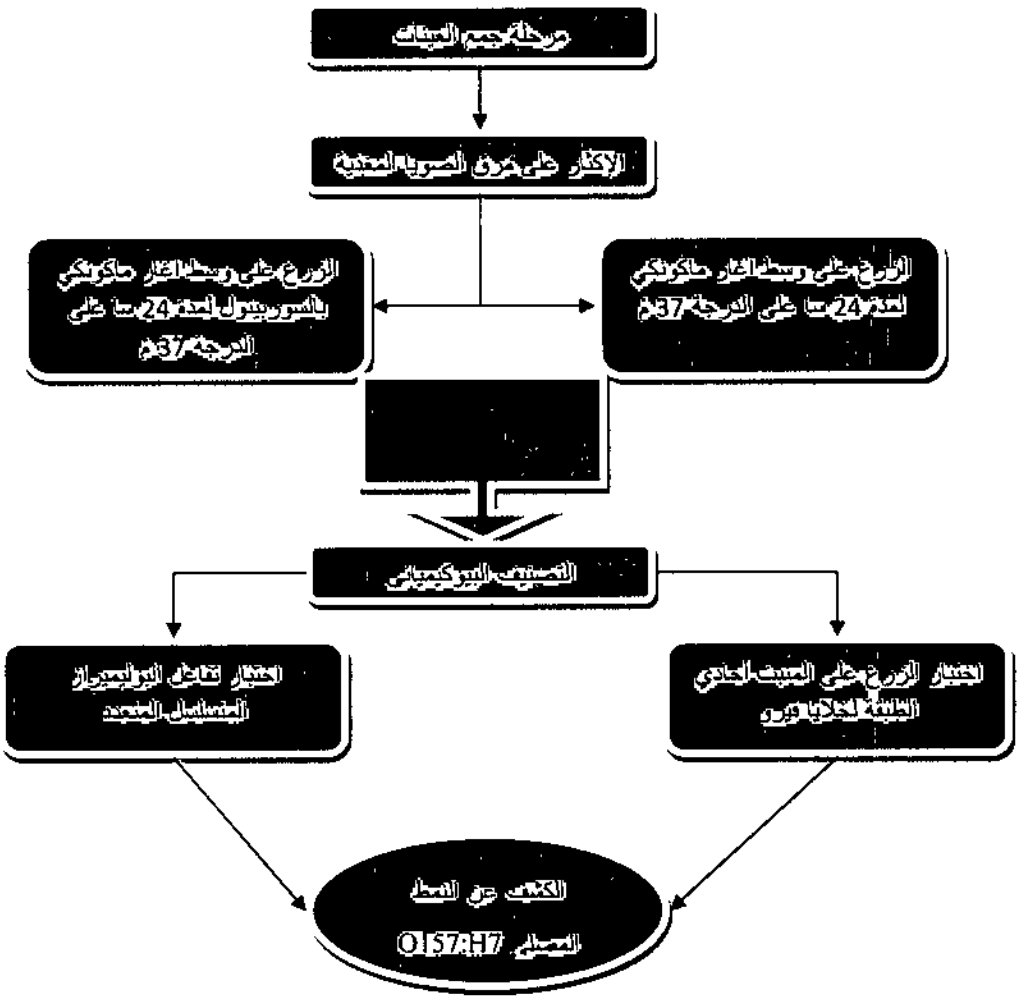
- **قراءة النتائج:**

تم فحص الأنابيب على ضوء غير مباشر مع خلفية معتمة. واعتبرت أي عينة إيجابية في حال أعطت تراص +2 أو أعلى. ويبين الجدول رقم 6 طريقة قراءة النتائج. كما يبين المخطط رقم 1 طرق العمل المتبعة.

الجدول رقم (6) : طريقة قراءة التراص في الأنابيب.

4+	100% تراص للخلايا، ويكون السائل الطافي رائقاً تماماً.
3+	75% تراص للخلايا، ويكون السائل الطافي قليل العكارة.
2+	50% تراص للخلايا، ويكون السائل الطافي متوسط العكارة.
1+	25% تراص للخلايا، ويكون السائل الطافي شديد العكارة.
±	أقل من 25% تراص للخلايا.
–	لا تراص.

المخطط رقم (1): رسم توضيحي يبين طرائق العمل



4- النتائج

Results

4- النتائج:

4-1- نتائج فحص عينات ذبائح الأبقار:

عند إجراء عمليات الزرع الجرثومي والتصنيف للعامل المسبب بالطرق المتبعة لعينات ذبائح الأبقار، أشارت النتائج إلى أن 35 عينة كانت سالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة (31.8%)، في حين كانت 75 عينة إيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة بغض النظر عن أنواع الجراثيم المعزولة (68.2%)، وتم تصنيف 80 ذرية من الإشْريكيَّة القولونيَّة من تلك العينات الإيجابية.

تم بعد ذلك إجراء الاختبارين الخاصين بالكشف عن الذراري المنتجة للذيفان السَّام لخلايا فيرو وهما: اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو للكشف عن التأثير القاتل للذيفان السَّام لخلايا فيرو على هذه الخلايا. واختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد، بغية الكشف عن حيازة هذه الذراري للجينات المشفرة للذيفان السَّام لخلايا فيرو-1 و-2 أحدهما أو كليهما.

دلت النتائج على وجود عينتان إيجابيتان لوجود الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو (1.8%).

وفي اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد بينت النتائج وجود عينتين إيجابيتين (1.8%) لوجود الجينات المشفرة لعوامل الضراوة المختبرة. حيث كانت هناك ذرية إيجابية لامتلاكها الجين المشفر للذيفان السَّام لخلايا فيرو-1 فقط (50%)، في حين أعطت ذرية أخرى نتيجة إيجابية لامتلاكها كلاً من الجين المشفر للذيفان السَّام لخلايا فيرو-1 *vt1* و الجين المشفر للذيفان السَّام لخلايا فيرو-2 *vt2* (50%). وهما نفس العينتان اللتان أعطتا نتائج إيجابية باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، حيث تطابقت نتائج اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو ونتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.

وعند إجراء التنميط المصلي لهاتين الذريتين لمعرفة ما إذا كانتا من الزمرة المصلية VTEC O157، كانت كلاهما سالبتين للاختبار ولا تنتميان للزمرة المصلية O157.

ويبين الجدول رقم 7 نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات ذبائح الأبقار. في حين يبين الجدول رقم 8 نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة من ذبائح الأبقار.

الجدول رقم(7): نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات ذبائح الأبقار.

عدد عينات ذبائح الأبقار المختبرة	عدد العينات السالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد العينات الإيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد الذراري المصنفة على أنها *E.Coli*
110	35 (%31.8)*	75 (%68.2)*	80

* تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات المختبرة.

الجدول رقم (8): نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة من ذبائح الأبقار.

د ذراري الـ *E.Coli* عزولة من ذبائح الأبقار	الذراري الإيجابية باختبار الزرع الخلوي		الذراري الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل				الذراري الإيجابية باختبار التراص في الأنابيب	
	عدد الذراري الإيجابية	النسبة المئوية	*vt1*	*vt2*	*vt1&vt2*	النسبة المئوية	O157:H7	O157
80	2	%1.8*	(%50) 1**	0	(%50)1**	%1.8*	0	0

* تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات المختبرة.

**تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد الذراري الإيجابية باختبار البوليميراز المتسلسل.

4-2- نتائج فحص عينات ذبائح الأغنام:

عند إجراء عمليات الزرع الجرثومي والتصنيف للعامل المسبب بالطرق المتبعة لعينات ذبائح الأغنام، أشارت النتائج إلى أن 20 عينة كانت سالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة (18.2%)، في حين كانت 90 عينة إيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة بغض النظر عن أنواع الجراثيم المعزولة (81.8%)، وتم تصنيف 110 ذرية إشْريكيَّةُ القولونيَّة من تلك العينات الإيجابية.

تم بعد ذلك إجراء الاختبارين الخاصين بالكشف عن الذراري المنتجة للذيفان السَّام لخلايا فيرو وهما، اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو. واختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.حيث بينت النتائج وجود 6 عينات إيجابية لوجود الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو (5.5%).

وفي اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد دلت النتائج على وجود 6 عينات إيجابية (5.5%) لوجود الجينات المشفرة لعوامل الضراوة المختبرة. حيث كانت هناك ذريتين إيجابيتين لامتلاكهما *vt1* فقط (33.3%)، في حين أعطت أربعة ذراري نتيجة إيجابية لامتلاكها كلاً من *vt1&vt2* (66.7%). وكانت نتائج اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو متطابقة مع نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.

وعند إجراء التنميط المصلي لهذه الذراري لمعرفة ما إذا كانت من الزمرة المصلية VTEC O157، أعطت جميع الذراري المختبرة نتيجة سالبة.

ويبين الجدول رقم 9 نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات ذبائح الأغنام. كما يبين الجدول رقم 10 نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة من ذبائح الأغنام.

الجدول رقم(9): نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات ذبائح الأغنام.

عدد عينات ذبائح الأغنام المختبرة	عدد العينات السالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد العينات الإيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد الذراري المصنفة على أنها *E.Coli*
110	20 (18.2%)*	90 (81.8%)*	110

* تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات المختبرة.

الجدول رقم (10): نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة من ذبائح الأغنام.

عدد ذراري الـ *E.Coli* المعزولة من ذبائح الأغنام	الذراري الإيجابية باختبار الزرع الخلوي		الذراري الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل				الذراري الإيجابية باختبار التراص في الأنابيب	
	عدد الذراري الإيجابية	النسبة المئوية	*vt1*	*vt2*	*vt1&vt2*	النسبة المئوية	O157:H7	O157
110	6	5.45%*	2 (33.3%)**	0	4(66.7%)**	5.45%*	0	0

* تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات المختبرة.

** تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد الذراري الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل.

4-3- نتائج فحص عينات ذبائح الماعز:

عند إجراء عمليات الزرع الجرثومي والتصنيف للعامل المسبب بالطرق المتبعة لعينات ذبائح الماعز، أشارت النتائج إلى أن 24 عينة كانت سالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة (24%)، في حين كانت 76 عينة إيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة بغض النظر عن أنواع الجراثيم المعزولة (76%)، وتم تصنيف 90 ذرية إشْريكيّةُ القولونيّة من تلك العينات الإيجابية.

تم بعد ذلك إجراء الاختبارين الخاصين بالكشف عن الذراري المنتجة للذيفان السّام لخلايا فيرو وهما اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، واختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.حيث بينت النتائج وجود 8 عينات إيجابية لوجود الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السّام لخلايا فيرو باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو (8%).

وفي اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد بينت النتائج وجود 8 عينات إيجابية (8%)، حيث كانت هناك ستّ ذراري إيجابية لامتلاكها الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-2 *vt2* فقط (75%)، في حين كانت هناك ذريتين إيجابيتين لامتلاكهما كلا من الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 و-2 *vt1&vt2* (25%). وكانت هي نفس العينات التي أعطت نتائج إيجابية باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، حيث تطابقت نتائج كلا الاختبارين.

وعند إجراء التنميط المصلي لهذه الذراري لمعرفة ما إذا كانت من الزمرة المصلية VTEC O157 كانت هناك ثلاث ذراري تنتمي للزمرة المصلية O157 (3%)، واحدة من هذه الذراري أعطت نتيجة إيجابية لكل من المستضد الجسدي O157 والمستضد الهدبي H7 أي أنها تنتمي للنمط المصلي O157:H7، في حين كانت الاثنتين الباقيتين إيجابيتين فقط للمستضد الجسدي O157.

ويبين الجدول رقم 11 نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات ذبائح الماعز. كما يبين الجدول رقم 12 نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة من ذبائح الماعز.

الجدول رقم (11): نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات ذبائح الماعز.

عدد عينات ذبائح الماعز المختبرة	عدد العينات السالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد العينات الإيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد الذراري المصنفة على أنها E.Coli
100	24 (%24)*	76 (%76)*	90

* تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات المختبرة

الجدول رقم (12): نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيّة القولونيّة المعزولة من ذبائح الماعز.

عدد ذراري الـ E.Coli المعزولة من ذبائح الماعز	الذراري الإيجابية باختبار الزرع الخلوي		الذراري الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل				الذراري الإيجابية باختبار التراص في الأنابيب	
	عدد الذراري	النسبة المئوية	vt1	vt2	vt1&vt2	النسبة المئوية	O157:H7	O157
90	8	%8*	0	**(%75)6	**(%25)2	%8*	1	2

* تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات المختبرة.

** تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد الذراري الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل.

4-4- نتائج فحص عينات حليب الأغنام:

عند إجراء عمليات الزرع الجرثومي والتصنيف للعامل المسبب بالطرق المتبعة للعينات، أشارت النتائج إلى أن هناك 34 عينة سالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة (68%)، في حين كانت هناك 16 عينة إيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة بغض النظر عن أنواع الجراثيم المعزولة (32%) وتم تصنيف 20 ذرية من العينات الإيجابية على أنها إشريكية قولونية.

تم بعد ذلك إجراء الاختبارين الخاصين بالكشف عن الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السّام لخلايا فيرو وهما اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، واختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.

وكانت جميع العينات المختبرة سالبة لوجود الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو بكل من اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو. واختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد. حيث تطابقت نتائج كل من الاختبارين.

ويبين الجدول رقم 13 نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات حليب الأغنام. كما يبين الجدول رقم 14 نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة من حليب الأغنام.

الجدول رقم (13): نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات حليب الأغنام.

عدد عينات حليب الأغنام المختبرة	عدد العينات السالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد العينات الإيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد الذراري المصنفة على أنها *E.Coli*
50	34 (68%)*	16 (32%)*	20

*تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات.

الجدول رقم (14): نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة من حليب الأغنام.

عدد ذراري الـ *E.Coli* المعزولة من حليب الأغنام	الذراري الإيجابية باختبار الزرع الخلوي		الذراري الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل			
	عدد الذراري	النسبة المئوية	*vt1*	*vt2*	*vt1&vt2*	النسبة المئوية
20	0	0%*	0	0	0	0%*

*تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات.

4-5- نتائج فحص عينات جبن الأغنام:

عند إجراء عمليات الزرع الجرثومي والتصنيف للعامل المسبب بالطرق المتبعة للعينات، أشارت النتائج إلى أن هناك 21 عينة سالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة (42%)، في حين كانت هناك 29 عينة إيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة بغضّ النظر عن أنواع الجراثيم المعزولة (58%)، وتم تصنيف 40 ذرية من العينات الإيجابية على أنها إشْريكيَّةُ قولونيّة.

تم بعد ذلك إجراء الاختبارين الخاصين بالكشف عن الإشْريكيَّة القولونيّة المنتجة للذيفان السّام لخلايا فيرو (اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد) حيث بينت النتائج أن جميع الذراري المختبرة كانت سالبة في كلا الاختبارين.

ويبين الجدول رقم 15 نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات جبن الأغنام. كما يبين الجدول رقم 16 نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة من جبن الأغنام.

الجدول رقم (15): نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات جبن الأغنام.

عدد عينات جبن الأغنام المختبرة	عدد العينات السالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد العينات الإيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد الذراري المصنفة على أنها E.Coli
50	21 (42%)*	29 (58%)*	40

*تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات.

الجدول رقم (16) : نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة من جبن الأغنام.

عدد ذراري الـ E.Coli المعزولة من جبن الأغنام	الذراري الإيجابية باختبار الزرع الخلوي		الذراري الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل			
	عدد الذراري	النسبة المئوية	*vt1*	*vt2*	*vt1&vt2*	النسبة المئوية
40	0	0%*	0	0	0	0%*

*تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات.

4-6- نتائج فحص عينات حليب الأبقار:

عند إجراء عمليات الزرع الجرثومي والتصنيف للعامل المسبب بالطرق المتبعة للعينات، أشارت النتائج إلى أن هناك 42 عينة سالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة (84%)، في حين أعطت 8 عينات نتائج إيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة بغض النظر عن أنواع الجراثيم المعزولة (16%) وتم تصنيف 11 ذرية من العينات الإيجابية على أنها إشريكية قولونية.

تم بعد ذلك إجراء الاختبارين الخاصين بالكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السَّام لخلايا فيرو (اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد) حيث بينت النتائج أن جميع الذراري المختبرة كانت سالبة في كلا الاختبارين.

ويبين الجدول رقم 17 نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات حليب الأبقار. كما يبين الجدول رقم 18 نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة من حليب الأبقار.

الجدول رقم (17) : نتائج الزرع الجرثومي لعينات حليب الأبقار.

عدد عينات حليب الأبقار المختبرة	عدد العينات السالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد العينات الإيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد الذراري المصنفة على أنها *E.Coli*
50	42 (84%)*	8 (16%)*	11

*تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات.

الجدول رقم (18) : نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السَّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة من حليب الأبقار.

عدد ذراري الـ *E.Coli* المعزولة من حليب الأبقار	الذراري الإيجابية باختبار الزرع الخلوي		الذراري الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل			
	عدد الذراري	النسبة المئوية	*vt1*	*vt2*	*vt1&vt2*	النسبة المئوية
11	0	0%*	0	0	0	0%*

*تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات.

4-7- نتائج فحص عينات جبن الأبقار :

عند إجراء عمليات الزرع الجرثومي و التصنيف للعامل المسبب بالطرق المتبعة للعينات، أشارت النتائج إلى أن هناك 27 عينة سالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة (54%)، في حين كانت هناك 23 عينة إيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة بغض النظر عن أنواع الجراثيم المعزولة (46%)، وتم تصنيف 32 ذرية من العينات الإيجابية على أنها إشْريكيّةُ قولونيّة.

تم بعد ذلك إجراء الاختبارين الخاصين بالكشف عن الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السّام لخلايا فيرو (اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد) حيث بينت النتائج أن جميع الذراري المختبرة كانت سالبة في كلا الاختبارين.

ويبين الجدول رقم 19 نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات جبن الأبقار. كما يبين الجدول رقم 20 نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيّة القولونيّة المعزولة من جبن الأبقار.

الجدول رقم (19): نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات جبن الأبقار.

عدد عينات جبن الأبقار المختبرة	عدد العينات السالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد العينات الإيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد الذراري المصنفة على أنها *E.Coli*
50	27 (%54)*	23 (%46)*	32

*تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات.

الجدول رقم (20): نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيّة القولونيّة المعزولة من جبن الأبقار.

عدد ذراري الـ *E.Coli* المعزولة من جبن الأبقار	الذراري الإيجابية باختبار الزرع الخلوي		الذراري الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل			
	عدد الذراري	النسبة المئوية	*vt1*	*vt2*	*vt1&vt2*	النسبة المئوية
32	0	%0*	0	0	0	%0*

*تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات.

4-8- نتائج فحص عينات الشاورما:

عند إجراء عمليات الزرع الجرثومي والتصنيف للعامل المسبب بالطرق المتبعة للعينات، أشارت النتائج إلى أن هناك 42 عينة سالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة (42%)، في حين كانت هناك 58 عينة إيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة بغض النظر عن الجراثيم المعزولة (58%)، وتم تصنيف 80 ذرية من العينات الإيجابية على أنها إِشْرِيكِيَّةٌ قولونيّة.

تم بعد ذلك إجراء الاختبارين الخاصين بالكشف عن الإِشْرِيكِيَّة القولونيّة المنتجة للذيفان السّام لخلايا فيرو (اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد) حيث بينت النتائج أن جميع الذراري المختبرة كانت سالبة في كلا الاختبارين.

ويبين الجدول رقم 21 نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات الشاورما، كما يبين الجدول رقم 22 نتائج اختبارات الكشف عن الإِشْرِيكِيَّة القولونيّة المنتجة للذيفان السّام لخلايا فيرو لذراري الإِشْرِيكِيَّة القولونيّة المعزولة من الشاورما.

الجدول رقم (21): نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات شاورما الدجاج.

عدد عينات شاورما الدجاج المختبرة	عدد العينات السالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد العينات الإيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد الذراري المصنفة على أنها *E.Coli*
100	42 (42%)*	58 (58%)*	80

*تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات.

الجدول رقم (22): نتائج اختبارات الكشف عن الإِشْرِيكِيَّة القولونيّة المنتجة للذيفان السّام لخلايا فيرو لذراري الإِشْرِيكِيَّة القولونيّة المعزولة من شاورما الدجاج.

عدد ذراري الـ *E.Coli* المعزولة من شاورما الدجاج	الذراري الإيجابية باختبار الزرع الخلوي		الذراري الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل			
	عدد الذراري	النسبة المئوية	*vt1*	*vt2*	*vt1&vt2*	النسبة المئوية
80	0	0%*	0	0	0	0%*

*تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات.

4-9- نتائج فحص عينات الهمبرغر :

عند إجراء عمليات الزرع الجرثومي والتصنيف للعامل المسبب بالطرق المتبعة للعينات، أشارت النتائج لوجود 15 عينة سالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة (30%)، في حين كانت هناك 35 عينة إيجابية بغض النظر عن أنواع الجراثيم المعزولة (70%)، وتم تصنيف 60 ذرية على أنها إشْريكيّةُ القولونيّة من تلك العينات الإيجابية.

تم بعد ذلك إجراء الاختبارين الخاصين بالكشف عن الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السّام لخلايا فيرو وهما اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، واختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.حيث بينت النتائج وجود 4 عينات إيجابية لوجود الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو (8%).

وفي اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد أشارت النتائج لوجود أربع عينات إيجابية (8%). حيث أعطت ذريتين نتيجة إيجابية لامتلاكها *vt1* فقط (50%)، في حين أعطت ذريتين أخريين نتيجة إيجابية لامتلاكهما كلا من *vt1&vt2* (50%). وكانت هي نفس العينات التي أعطت نتائج إيجابية باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو حيث تطابقت نتيجة الاختبارين.

وعند إجراء التنميط المصلي لهذه الذراري لمعرفة ما إذا كانت من الزمرة المصلية VTEC O157، أشارت النتائج لوجود ذريتين من النمط المصلي VTEC O157:H7 (4%).

ويبين الجدول رقم 23 نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات الهمبرغر. كما يبين الجدول رقم 24 نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيّة القولونيّة المعزولة من الهمبرغر.

الجدول رقم (23): نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات الهمبرغر.

عدد عينات الهمبرغر المختبرة	عدد العينات السالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد العينات الإيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد الذراري المصنفة على أنها *E.Coli*
50	15 (30%)*	35 (70%)*	60

*تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات المختبرة.

الجدول رقم (24): نتائج اختبارات الكشف عن الإشريكية القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو لذراري الإشريكيّة القولونيّة المعزولة من الهمبرغر.

عدد ذراري الـ *E.Coli* المعزولة من عينات الهمبرغر	الذراري الإيجابية باختبار الزرع الخلوي		الذراري الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل				الذراري الإيجابية باختبار التراص في الأنابيب
	عدد الذراري	النسبة المئوية	*vt1*	*vt2*	*vt1&vt2*	النسبة المئوية	O157:H7
60	4	%8*	2(%50)**	0	2(%50)**	%8*	2(%4)*

*تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات المختبرة.

**تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد الذراري الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل.

4-10- عينات روث الأبقار والأغنام :

بما أن الحيوانات بشكل عام والمجترات بشكل خاص تشكل الثوي الخازن الطبيعي للإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو، وباعتبار أن التلوث بالروث للذبائح في المسالخ والحليب أثناء عملية الحلابة هي نقطة الاختراق الأساسية التي تنفذ من خلالها الجرثومة إلى السلسلة الطعامية، ونتيجة عدم توافر أي دراسة عن نسبة انتشار هذه المجموعة المرضية عند الحيوانات في الجمهورية العربية السورية بالرغم من الأهمية البالغة التي تحتلها هذه الجرثومة بين المسببات المرضية المنقولة بالغذاء في العالم، فقد أجرينا خطوة متممة في هذه الدراسة لم تكن ضمن الأهداف الأساسية التي قامت عليها، ألا وهي جمع عينات من روث الأبقار والأغنام السليمة واختبارها للكشف عن الإِشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو فيها وذلك بنفس الطرائق المخبرية التي اعتمدناها للكشف عن مدى تواجد الجرثومة في العينات الغذائية والتي تشكل لب البحث والهدف الأساسي له. والتمكن بالتالي من الربط بين نسبة انتشارها في الحيوانات ومعدل تلوث الأغذية بها، وذلك لتكوين صورة شبه كاملة عن وضع الإِشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في الجمهورية العربية السورية.

4-10-2- نتائج فحص عينات روث الأبقار :

عند إجراء عمليات الزرع الجرثومي والتصنيف للعامل المسبب بالطرق المتبعة لهذه العينات، كانت جميع العينات إيجابية بالطبع للزرع الجرثومي، وتم تصنيف 100 ذرية من العينات على أنها إِشْريكيَّةُ قولونيَّة.

تم بعد ذلك إجراء الاختبارين الخاصين بالكشف عن الإِشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السّام لخلايا فيرو وهما اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، واختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.حيث أشارت النتائج إلى وجود 29 عينة إيجابية لوجود الإِشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو (72.5%).

وفي اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد بينت النتائج وجود 30 عينة إيجابية (75%) لوجود الإِشْريكيَّة القولونيَّة الحاملة للجينات المشفرة لعوامل الضراوة المختبرة. حيث أعطت

15 ذرية نتيجة إيجابية لامتلاكها الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 *vt1* فقط (50%)، وأعطت 7 ذراري نتيجة إيجابية لامتلاكها الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-2 *vt2* فقط (23.3%)، في حين أعطت 8 ذراري أخرى نتيجة إيجابية لامتلاكها كلا من *vt1&vt2* (26.7%).

وعند مقارنة العينات التي أعطت نتيجة إيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد مع تلك التي أعطت نتيجة إيجابية باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو.تبين تطابق 29 عينة أعطت نتيجة إيجابية في كل من الاختبارين. في حين كانت هناك عينة واحدة أعطت نتيجة إيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل وكانت سالبة باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو.

وعند إجراء التنميط المصلي لهذه الذراري(الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد) لمعرفة فيما إذا كانت من الزمرة المصلية VTEC O157 كانت هناك 9 عينات إيجابية للزمرة المصلية VTEC O157 (22.5%)، حيث كانت 6 ذراري منها تنتمي للنمط المصلي O157:H7.

ويبين الجدول رقم 25 نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات روث الأبقار. كما يبين الجدول رقم 26 نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيّة القولونيّة المعزولة من روث الأبقار.

الجدول رقم (25): نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات روث الأبقار.

عدد عينات روث الأبقار المختبرة	عدد العينات السالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد العينات الإيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد الذراري المصنفة على أنها *E.Coli*
40	0	*(%100)40	100

*تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات.

الجدول رقم (26): نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيّة القولونيّة المعزولة من روث الأبقار.

عدد ذراري الـ E.Col المعزولة من روث الأبقار	الذراري الإيجابية باختبار الزرع الخلوي		الذراري الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل				الذراري الإيجابية باختبار التراص في الأنابيب	
	عدد الذراري	النسبة المئوية	*vt1*	*vt2*	*vt1&vt2*	النسبة المئوية	O157:H7	O157
100	29	*%72.5	**(%50)15	**(%23.3)7	**(%26.7)8	*%75	6	3

*تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات.

**تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد الذراري الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل.

4-10-1- نتائج فحص عينات روث الأغنام :

عند إجراء عمليات الزرع الجرثومي والتصنيف للعامل المسبب بالطرق المتبعة لهذه العينات، كانت كل العينات إيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة (100%) وتم تصنيف 100 ذرية من العينات الإيجابية على أنها إشريكية قولونية.

تم بعد ذلك إجراء الاختبارين الخاصين بالكشف عن الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السّام لخلايا فيرو وهما اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، واختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.حيث أشارت النتائج لوجود 25 عينة إيجابية لوجود الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السّام لخلايا فيرو باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو (62.5%).

وفي اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد بينت النتائج وجود 28 عينة إيجابية لوجود الإشْريكيّة القولونيّة الحاملة للجينات المشفرة لعوامل الضراوة المختبرة (70%)، حيث أعطت 16 ذرية نتيجة إيجابية لامتلاكها الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 *vt1* فقط (57.1%)، في حين أعطت 4 ذراري نتيجة إيجابية لامتلاكها الجين المشفر للذيفان السّام لخلايا فيرو-2 *vt2* فقط (14.3%)، كما أن هناك 8 ذراري أخرى أعطت نتيجة إيجابية لامتلاكها كلا من الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 و-2 *vt1&vt2* (28.6%).

وعند مقارنة العينات التي أعطت نتيجة إيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد مع تلك التي أعطت نتيجة إيجابية باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو.تبين

تطابق 25 عينة أعطت نتيجة إيجابية في كل من الاختبارين. في حين كانت هناك 3 عينات أعطت نتيجة إيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل وكانت سالبة باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو.

وعند إجراء التنميط المصلي لهذه الذراري (الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد) لمعرفة فيما إذا كانت من الزمرة المصلية VTEC O157، أوضحت النتائج وجود 5 ذراري إيجابية للزمرة المصلية VTEC O157 (12.5%)، اثنتين منها كانت تنتمي للنمط المصلي O157:H7.

ويبين الجدول رقم 27 نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات روث الأغنام. كما يبين الجدول رقم 28 نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة من روث الأغنام.

الجدول رقم (27) : نتائج الزرع والتصنيف الجرثومي لعينات روث الأغنام.

عدد عينات روث الأغنام المختبرة	عدد العينات السالبة للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد العينات الإيجابية للزرع الجرثومي بالطرق المتبعة	عدد الذراري المصنفة على أنها *E.Coli*
40	0	40(100%)*	100

*تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات.

الجدول رقم (28) : نتائج اختبارات الكشف عن الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفانْ السّام لخلايا فيرو لذراري الإشْريكيَّة القولونيَّة المعزولة من روث الأغنام.

عدد ذراري الـ *E.Coli* المعزولة من روث الأغنام	الذراري الإيجابية باختبار الزرع الخلوي		الذراري الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل				الذراري الإيجابية باختبار التراص في الأنابيب	
	عدد الذراري	النسبة المئوية	*vt1*	*vt2*	*vt1&vt2*	النسبة المئوية	O157:H7	O157
100	25	62.5%*	16(57.1%)**	4(14.3%)**	8(28.6%)**	70%*	2	3

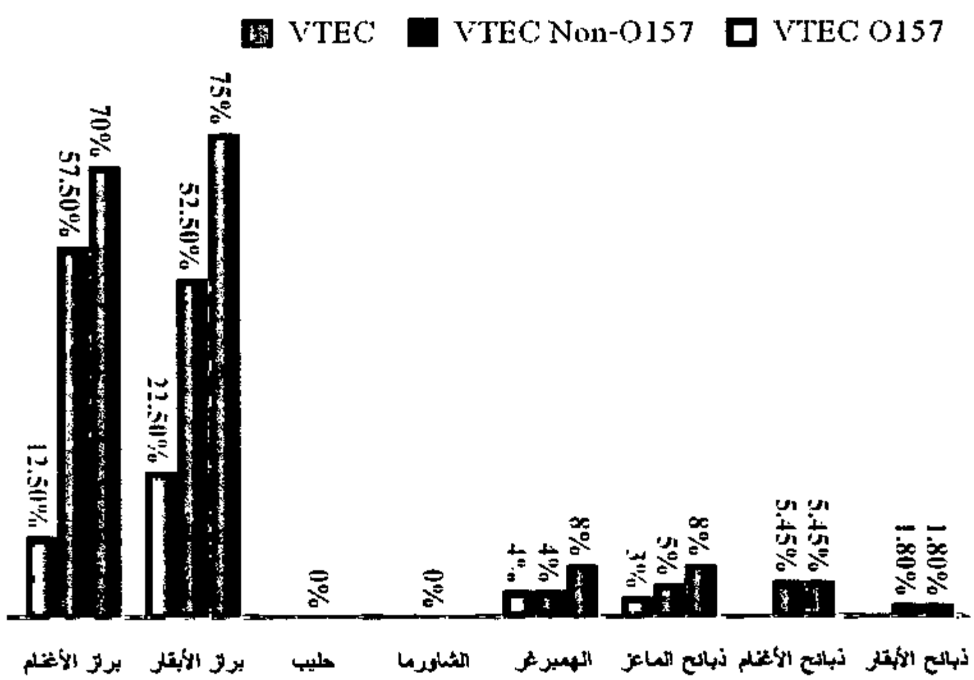
*تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد العينات.

**تم حساب النسبة المئوية بالنسبة لعدد الذراري الإيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل.

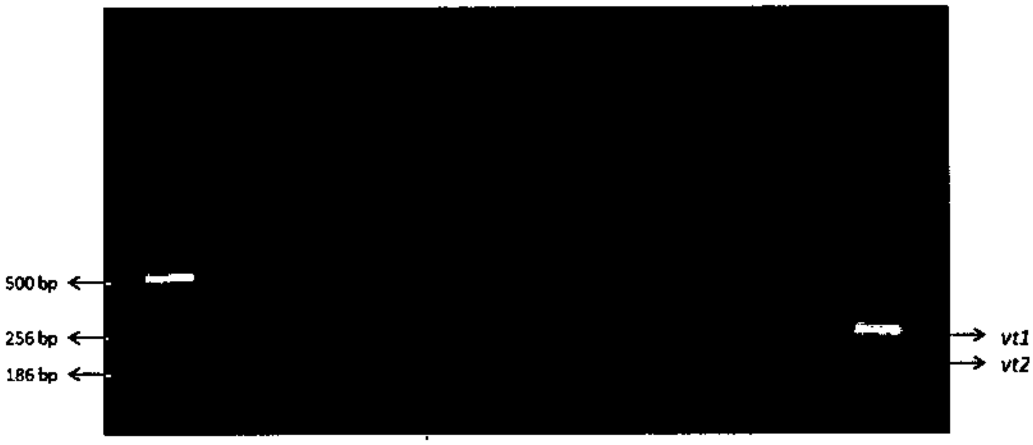
ملخص النتائج :

تم في هذه الدراسة عزل 78 ذرية من الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو وذلك من 670 عينة تم جمعها من المنتجات الغذائية و80 عينة روث تم جمعها من الأبقار والأغنام، حيث بلغت نسبة انتشار الـ VTEC ‏2.9% في العينات الغذائية (VTEC Non-O157: 2.2%, VTEC O157: 0.7%)، وأشارت نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد للـ 78 ذرية أن 35 ذرية منها كانت تملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 فقط (44.9%)، 17 ذرية منها تملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-2 فقط (21.8%)، في حين كانت 26 ذرية منها تملك الاثنين معاً (33.3%). وأشارت نتائج اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو إلى أن 74 ذرية منها كانت منتجة للذيفانات السامة لخلايا فيرو عند اختبارها. ويوضح المخطط البياني رقم 1 نسبة انتشار الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في العينات التي تم جمعها. كما تبين الصور من (1) – (5) بعض نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.

المخطط البياني رقم (1): نسبة انتشار الإشْريكيَّة القولونيَّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في العينات المجموعة

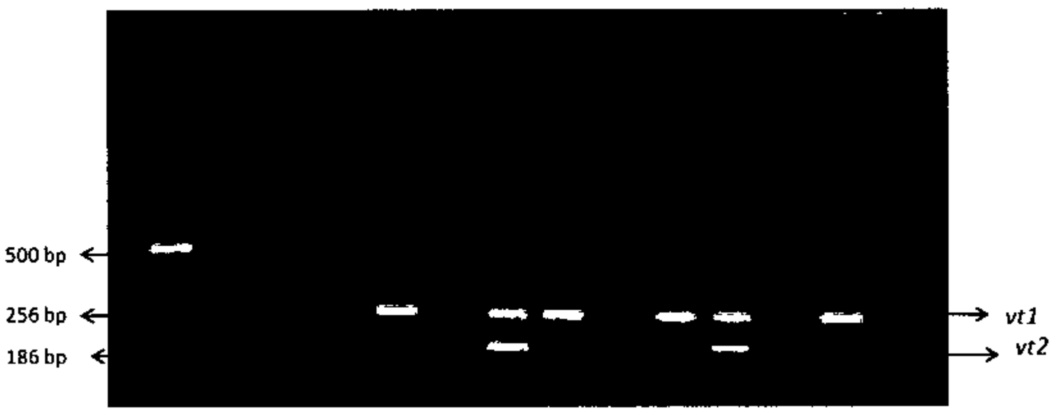


الصورة رقم (1): بعض نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.



حيث يظهر في الصورة رقم 1 العمود الأول من اليسار (M) الذي هو عن معلم الوزن الجزيئي العياري التي تمت قراءة أنطقة الـ DNA عليه وتظهر الأعمدة من 1- 10 سلبية حيث لم تعطي أي نطاق على المستويات المحددة، في حين يظهر العمود رقم 11 وعليه نطاقين واحد على الوزن 256 أساس آزوتي أي إيجابي للجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1، والثاني على الوزن 186 أساس آزوتي أي إيجابي للجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-2، أي أن العمود إيجابي لكل من vt_1, vt_2.

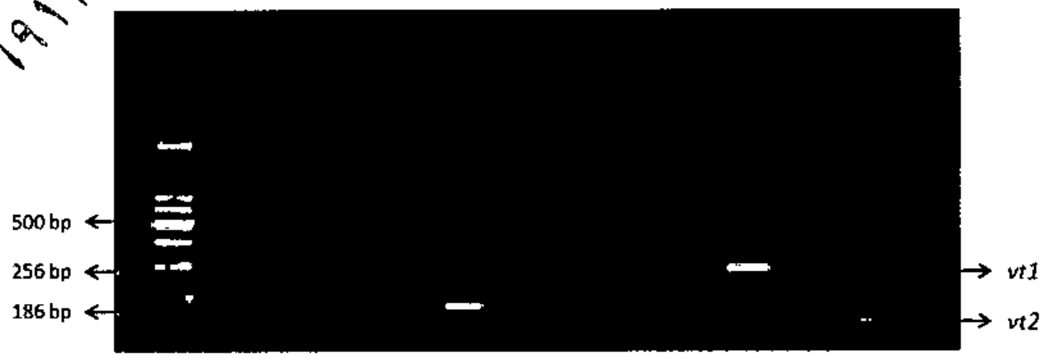
الصورة رقم (2): بعض نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.



أيضاً في الصورة رقم 2 ، أعطت كل من الأعمدة 12، 13، 14، 16، 19، 22، 24 نتائج سالبة للجينات المختبرة ، في حين أعطت الأعمدة رقم 15، 18، 20، 23 نتيجة إيجابية للجين

المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 ، و الأعمدة رقم 17، 21 نتيجة إيجابية لكل من الـــ vt_1, vt_2.

الصورة رقم (3): بعض نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.



الصورة رقم (4): بعض نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.



وفي الصورة رقم 4 ، أعطت العمود رقم 38 نتيجة إيجابية للـــ vt_1 ، والأعمدة رقم 39، 43، 45 نتيجة إيجابية للـــ vt_2 ، في حين أعطت الأعمدة رقم 40، 41، 42 نتيجة إيجابية لكل من الـــ vt_1, vt_2.

الصورة رقم (5): بعض نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد.



5- المناقشة

Discussion

5- المناقشة:

تأتي أهمية هذه الدراسة كونها الدراسة الأولى من نوعها التي تتقصى عن الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في المنتجات الحيوانية في سوريا.

إنّ مقارنة نسبة انتشار الـ VTEC بين الدراسات أمرٌ خاضع لبعض الحدود والتقييدات، منها اختلاف طرق المعاينة Sampling وحجم العينات بين الأبحاث. يتبعه الاختلاف الكبير في الطرق والإجراءات المتبعة في عزل الـ VTEC والكشف عنها، حيث لا توجد إجراءات موحّدة بين المخابر خاصّة بالكشف عن الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو بشكل عام وخاصة في ما يتعلق بالإشريكية القولونية VTEC Non-O157. وأخيراً فإن معظم الأبحاث والدراسات ركّزت على الزمرة المصلية VTEC O157 وخاصة النمط المصلي VTEC O157:H7 وذلك لأسبابٍ عديدة منها امتلاكُ معظم ذراري هذه الزمرة المصلية لخصائص فارقة مميزة، بالإضافة لأنه النمط المصلي الأوّل الذي ارتبط اسمه مع الأوبئة البشرية حتى أنه كان يظن في البداية أنه يمثّل كامل مجموعة الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو وكان يعتقد أن امتلاك ذراري هذا النمط المصلي للمستضد O157 أحد عوامل الضراوة فيه، وقد ثبت خطأ هذا الاعتقاد لاحقاً. بنفس الوقت الذي قللت فيه معظم الأبحاث من تقدير أهمية الـ VTEC Non-O157 وذلك لعدم امتلاك معظم المخابر التقنيات المخبرية اللازمة التي تمكنها من الكشف عنها (**Riley *et al* ., 1983**) **(Farmaer, 1995) (Griffin And Tauxe, 1991) (Pai *et al* ., 1984)** .**(Mora *et al* ., 2007) (Boyce *et al* ., 1995)**

وبالرجوع إلى نتائج هذه الدراسة، فقد أشارت نتائج فحص ذبائح الأبقار للتقصي عن الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو إلى أن نسبة تواجدها كانت 1.8% (VTEC Non-O157: 1.8%, VTEC O157: 0%) ما يعني بالتأكيد حدوث تلوث في المسلخ، ما يشير إلى انخفاض مستوى الأمن الحيوي الصحي المتبع في المسالخ. كما أشارت نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد إلى أن 50% من الذراري المعزولة تملك كلاً من الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 و-2 ما يعني بأنها قادرة على التسبّب بالأمراض

المترافقة مع الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو وتشكل بالتالي خطراً على الصحة العامة.

وتتفق هذه النتيجة مع ما ذكره **بيررارد وزملاءه** في بلجيكا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC في لحوم الأبقار 1.8% (VTEC O157: 0%) (**Pie'Rard *et al* ., 1997**).
وتتفق نتائج الدراسة أيضاً مع ما ذكره **روجيري وزملاءه** في فرنسا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC 1.9% في ذبائح الأبقار (VTEC O157: 0%) (**Rogerie *et al* ., 2001**). كما تتفق النتائج تقريباً مع ما ذكره **ليونغ وزملاءه** في الصين حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC Non-O157 1.8%، ولكن نسبة الـ VTEC O157 في دراستهم كانت 2.2% وهذا أكثر من نتائج الدراسة (**Leung *et al* ., 2001**). كذلك تتفق نتائج الدراسة مع ما ذكره **ريغوبيلو وزملاءه** في الروثيل حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC في ذبائح الأبقار 1.25% (**Rigobelo *et al* ., 2006**)، وكذلك تتفق النتائج مع دراسة أخرى في الروثيل كانت نسبة انتشار الـ VTEC في ذبائح الأبقار فيها 1.4% (VTEC O157: 0%) (**Rigobelo *et al* ., 2008**).

كما تتفق نتائج الدراسة تقريباً مع ما ذكره **كويا وزملاءه** في اسكتلندا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 0.1% (**Coia *et al* ., 2001**)، وكذلك تتفق تقريبا مع ما ذكره **لوكاسوفا وزملاءه** في التشيك حيث كانت نسبة الـ VTEC O157 في ذبائح الأبقار 0.1% (**Lukásová *et al* ., 2004**).

وكانت نسبة الانتشار التي حصلنا عليها أقلّ مما ذكره **دويل وسشويني** في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 3.7% في لحوم الأبقار (**Doyle and Schoeni, 1987**). كما كانت أقل مما ذكره **ريد وزملاءه** في كندا حيث كانت نسبة انتشار الجرثومة في لحوم الأبقار 10.4% ولو اتفقت معهم في عدم وجود الـ VTEC O157 في لحوم الأبقار(**Read *et al* ., 1990**). وينطبق الكلام السابق على ما خرج به كل من **سوذينكول وزملاءه** في تايلاند حيث كانت نسبة انتشار VTEC 8% في ذبائح الأبقار (VTEC O157: 0%) (**Suthienkul *et al* ., 1990**)، وما ذكره **سامادبور وزملاءه** في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC 23% في لحوم الأبقار (VTEC

(O157: 0%) (Samadpour *et al* ., 1994). وكذلك ما خرج به **براديل وزملاءه** في فرنسا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC 11% في لحوم الأبقار (VTEC O157: 0%) (**Pradel** ***et al*** **., 2000**). كما كانت النتائج أقل مما ذكره **بروكس وزملاءه** في نيوزلندا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC في لحوم الأبقار 12% (**Brooks** ***et al*** **., 2001**).

كما كانت النتائج أقل بكثير مما ذكره **آرثر وزملاءه** في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC Non-O157 في ذبائح الأبقار 54% (**Arthur** ***et al*** **., 2002**)، وكذلك أقل مما ذكره **غالالاهار وزملاءه** حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC 17.4% في ذبائح الأبقار (**Gallagher** ***et al*** **., 2003**)، كما كانت أقل مما ذكره **شاهد وزملاءه** في الجزائر حيث كانت نسبة الـ VTEC 20% (**Chahed** ***et al*** **., 2006**). كما كانت النتائج أقل مما ذكره **كوبولد وزملاءه** في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC 36%، 23% في لحوم وذبائح الأبقار على التوالي (**Cobbold** ***et al*** **., 2008**).

وكانت النتائج أقل مما ذكره **إيلدر** وزملاءه في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 18% في ذبائح الأبقار (**Elder** ***et al*** **., 2000**). وأقل مما ذكره **بوناردي وزملاءه** في إيطاليا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 12% في ذبائح الأبقار (**Bonardi** ***et al*** **., 2001**)، كما كانت أقل أيضا مما ذكره **الصافي والرعوف** في مصر حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 في لحوم الأبقار 5% (**الصافي والرعوف، 2003**). وكانت النتائج أقل من ما ذكره **أولونسو وزملاءه** في إيطاليا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 في ذبائح الأبقار 11% (**Alonso** ***et al*** **., 2007**). وكذلك كانت النتائج أقل مما ذكره **بينيدوس وزملاءه** في المغرب حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 في لحوم الأبقار 9% (**Beneduce** ***et al*** **., 2008**).

كما كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 0% وهذا أقل مما ذكره **شابمان وزملاءه** في المملكة المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 1.4% في ذبائح الأبقار (**Chapman** ***et al*** **., 2001**)، وأقل أيضا مما ذكره **توتينيل وزملاءه** في بلجيكا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 1.02% في ذبائح الأبقار (**Tutenel** ***et al*** **.,**

2003)، وكذلك مع ما ذكره **كارني وزملاءه** في ايرلندا حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157 3% في ذبائح الأبقار **(Carney *et al* ., 2006)**.

ويمكن أن ترجع الاختلافات لعوامل عديدة يأتي في أولها درجة الأمن الحيوي ومستوى الإجراءات الصحية المتبعة في المسالخ حيث تتناسب عكساً معها وخاصة تلك المتبعة في النهاية قبل إرسال الذبائح للتبريد والتوزيع حيث تلعب الدور الحاسم في التقليل من نسبة وجود الجرثومة فيها في حال كانت صارمة وفعالة **(Arthur *et al* ., 2002)**. يأتي بعد ذلك المرحلة التي تم أخذ العينات منها في المسلخ حيث تقل النسبة في معظم الأحيان كلما شارفت مرحلة معاملة الذبائح على الانتهاء (التقطيع والتبريد) **(Gallagher *et al* ., 2003)**. بالإضافة لنوع المسلخ الذي تمّ أخذ العينات منه حيث تقل النسبة في حال كون المسلخ آلي **(Elder *et al* ., 2000)**. كما تلعب المنطقة التي تمَّ أخذ العينات منها في الذبيحة دوراً مهماً في تحديد نسبة انتشار الجرثومة، حيث تزداد النسبة في حال كانت المنطقة على تماس مع محتويات الأمعاء والجلد **(Alonso *et al* ., 2007)**. كما يلعب الموسم (الفصل) الذي تم جمع العينات فيه دوراً مهماً، حيث ترتفع نسبة انتشار الـــ VTEC في فصل الصيف وحتى بدايات فصل الخريف والذي يعود بدوره لزيادة طرح الجرثومة من الأبقار الحاملة لها، حتى أن عدد الإصابات البشرية المسجلة بالإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو ترتفع في فصل الصيف بشكل ملحوظ **(Rhoades *et al* ., 2009)**. بالإضافة لكل ذلك تلعب التقنيات والإجراءات المستعملة في الأبحاث دوراً حاسماً في تحديد نسبة انتشار الـــ VTEC حيث تختلف في حساسيتها ونوعيتها **(Duffy et el., 2001)**[a]. كما تختلف نسبة انتشار الجرثومة بين الأبحاث تبعاً للمنطقة الجغرافية **(Duffy et el., 2001)**[b].

وبالعودة إلى نتائج فحص ذبائح الأغنام فقد أشارت نتائج هذا العمل إلى وجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو بنسبة 5.5% (VTEC Non-O157: 5.5%, VTEC O157: 0%)، وتشكل هذه النسبة المرتفعة دليلا واضحا على الضعف الشديد في إجراءات الأمن الصحي المتبعة في المسالخ التي تم أخذ العينات منها، كما بينت نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد أن 66.7% من الذراري المعزولة تملك كلا من الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 و-2 ما يعني بأنها تشكل تهديداً حقيقياً لصحة البشر.

وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره **بيررارد وزملاءه** في بلجيكا حيث كانت نسبة انتشار الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في لحوم الأغنام 4% (VTEC O157: 0%) (**Pie´Rard *et al* ., 1997**). كما تتفق النتائج مع ما ذكره **مبروك** في النمسا حيث كانت جميع عينات لحوم الأغنام التي اختبرها سلبية للـ VTEC O157 (**مبروك، 2002**).

ولا تختلف نتائج الدراسة كثيرا مع ما ذكره **شابمان وزملائه** في المملكة المتحدة حيث كانت نسبة الـ VTEC O157 في ذبائح الأغنام 0.7% (**Chapman *et al* ., 2001**). وأيضاً ما ذكره **لينهان وزملاءه** في إيرلندا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 في ذبائح الأغنام 1% (**Lenahan *et al* ., 2007**).

في حين كانت أقل مما ذكره **دويل وسشويني** في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 لحوم الأغنام 2% (**Doyle and Schoeni, 1987**). كما كانت النتائج أقل مما ذكره **سامادبور وزملاءه** في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC Non-O157 48% في لحوم الأغنام ولو كانت تتفق معهم من ناحية عدم وجود الـ VTEC O157 (**Samadpour *et al* ., 1994**). كما كانت النتائج أقل مما ذكره **بروكس وزملاءه** في نيوزلندا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC في لحوم الأغنام 17% (**Brooks *et al* ., 2001**).وكانت النتائج أقل مما ذكره **الصافي والرعوف** في مصر حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 4% في لحوم الأغنام (**الصافي والرعوف، 2003**). كذلك كانت النتائج أقل مما ذكره **زويفيل وستيفان** في سويسرا حيث كانت نسبة انتشار الجرثومة في ذبائح الأغنام 36.6% (**Zweifel and Stephan, 2003**). وكانت النتائج أقل مما ذكره **كالشاياناند وزملاءه** في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC في ذبائح الأغنام 81.8% (**Kalchayanand *et al* ., 2007**). وكانت النتائج أقل أيضا مما ذكره **شيكارفوروش وزملاءه** في إيران حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 3.92% في ذبائح الأغنام (**Shekarforoush *et al* ., 2008**).

وتعود الاختلافات بين النتائج لنفس العوامل التي ذكرت في السابق في ذبائح الأبقار، حيث تلعب درجة الأمن الحيوي الصحي في المسالخ المرتبة الأولى في تحديد نسبة انتشار الجرثومة في الذبائح (**Kalchayanand *et al* ., 2007**) (**Zweifel *et al* ., 2004**)،

كما أن لفصل السنة (الموسم) الذي تم جمع العينات فيه تأثيراً كبيراً على نسبة انتشار الجرثومة في الذبائح، حيث ترتفع صيفاً بشكل ملحوظ (**Shekarforoush *et al* ., 2008**). ولكن يجب ذكر أنَّ قِلّة من الدراسات - مقارنة مع تلك في الأبقار- أجريت على الأغنام، وركّزت معظمها على الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو O157:H7. مع أنها تعتبر من أهم الأثوياء الخازنة للـ VTEC، حتى أن بعض الدراسات أشارت إلى أن نسبة انتشار الـ VTEC في الأغنام أعلى من الأبقار[b] (**Duffy et el., 2001**) .

أما في ما يتعلق بنسبة انتشار الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في ذبائح الماعز فقد أوضحت النتائج وجودها بنسبة 8% (VTEC Non-O157: 5%, VTEC O157: 3%)، وتدل هذه النسبة المرتفعة على وجود خلل خطير في الإجراءات الصحية المتبعة في المسالخ المدروسة. كما بينت نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل أن 100% من الذراري المعزولة تملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-2 وهو من أهم عوامل الضراوة التي تملكها الجرثومة ويمكنها من التسبب بالأمراض للبشر.

ولم تصل إلى يدنا أي دراسة أجريت على وجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في ذبائح الماعز، ولكن هناك بحث أجري في بنغلاديش وتقصى فيه **إسلام وزملاءه** عن الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في روث الماعز ، حيث أشاروا إلى وجود الـ VTEC في روث الماعز بنسبة 20.8% (VTEC O157 9.1%) .(**Islam *et al* ., 2008**)

ولدى فحص عينات الحليب والجبن البقري فقد أوضحت نتائج الدراسة أن جميع عينات حليب وجبن الأبقار المختبرة سلبية لوجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو.

وتتفق نتائج هذه الدراسة مع ما ذكره **كويا وزملاءه** في اسكتلندا حيث كانت جميع عينات حليب وجبن الأبقار سالبة لوجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو (**Coia *et al* ., 2001**) في حين تختلف مع ما ذكره ويلس وزملاءه في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 في حليب الأبقار 4.4% (**Wells *et al* ., 1991**)، وأقل أيضا مما ذكره **براديل وزملاءه** في فرنسا حيث كانت نسبة انتشار الـ

VTEC في جبن الأبقار 10% (**Pradel *et al* ., 2000**)، كما كانت النتائج أقل مما ذكره **سيد وحسين** في مصر حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157 3.3% (**سيد وحسين، 2003**)، و أقل مما ذكره **الصافي والرعوف** في مصر حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157 5% في حليب الأبقار (**الصافي والرعوف، 2003**)، وكانت النتائج أقل مما ذكره **لوكاسوفا وزملاءه** في التشيك حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157 في حليب الأبقار 0.4% (**Lukásová *et al* ., 2004**)، وأقل مما ذكره **كوبولد وزملاءه** في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157 في حليب الأبقار 21% (**Cobbold *et al* ., 2008**).

ونعتقدُ بأنّ خلو عينات جبن الأبقار المجموعة من الـــ VTEC يمكن أن يكون ناتجاً عن أنْ عينات الجبن التي تم أخذ العينات منها ليست طازجة وإنما مملحة (مغمورة)، ومبردة ومخزنة لمدة 2-3 أشهر، حيث يمكن أن تكون هذه الظروف هي التي أدت لخلو عينات الجبن المجموعة من هذه الجرثومة.

ويمكن تفسير الاختلافات بين النتائج تبعاً لاختلاف طرق المعاينة، والإجراءات المستعملة في العزل والتقصي عن الجرثومة بين الدراسات **(Duffy *et al* ., 2001)[a]**، بالإضافة للدور الكبير الذي يلعبه الموسم الذي تم جمع العينات فيه حيث ترتفع النسبة في حال جمع العينات صيفاً، والذي يعود بدوره لزيادة طرح الإشريكية القولونية المنتجة للذيفانات السامة لخلايا فيرو من الحيوانات الحاملة لها. كما تلعب المنطقة الجغرافية دورا مهماً في ذلك. **(Duffy *et al* ., 2001)[b]**

ويجب ذكر أن قلة قليلة من الدراسات ركزت على وجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في منتجات الأبقار من الحليب والأجبان، ومعظمها ركزت على النمط المصلي O157:H7 ويعود ذلك لقلّة عدد الأوبئة التي نتجت عن استهلاك هذه المنتجات. في حين تحتل اللحوم البقرية غير المطهوة بشكل جيد المرتبة الأولى من حيث عدد الدراسات التي أجريت على هذا الموضوع (**Cobbold *et al* ., 2008**).

وبينت نتائج فحص عينات الحليب والجبن المأخوذة من الأغنام أن جميع العينات المختبرة كانت خالية من الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام فيرو.

ولم تصل إلى يدنا أي دراسة أجريت على هذه العينات، وذلك نتيجة قلة الدراسات التي أجريت على وجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في الأغنام بشكل عام.

ونَعتقدُ بأنّ خلو عينات جبن الأغنام المجموعة من الـــ VTEC يمكن أن يكون ناتجاً عن نفس السبب الذي ذكرناه سابقاً في جبن الأبقار حيث أنّ وجبات الجبن التي تم أخذ العينات منها ليست طازجة وإنما مملحة (مغمورة)، ومبردة ومخزنة لمدة 2-3 أشهر، حيث يمكن أن تكون هذه الظروف هي التي أدت لخلو عينات الجبن المجموعة من الجرثومة.

وبالنسبة لعينات شاورما الدجاج فقد أشارت نتائج الدراسة إلى أن جميع عينات الشاورما المختبرة كانت سلبية لوجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو.

ولم تصل إلى يدنا أي دراسة أجريت على وجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في الشاورما ولكن هناك العديد من الدراسات التي أجريت على وجود الـــ VTEC في لحوم وروث الدجاج و التي سنأتي على ذكرها.

حيث اتفقت نتائج الدراسة مع ما ذكره **ريد وزملاءه** في كندا حيث كانت جميع عينات لحوم الدجاج سالبة لوجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو (**Read *et al* ., 1990**). كما تتفق النتائج مع ما ذكره مبروك في النمسا حيث كانت جميع عينات لحوم الدجاج سالبة لوجود الـــ VTEC O157 (**مبروك، 2002**). وأيضاً تتفق النتائج مع ما ذكره **توتينيل وزملاءه** في بلجيكا حيث كانت جميع عينات لحوم الدجاج المدروسة سالبة لوجود الـــ VTEC O157 (**Tutenel *et al* ., 2003**). كما تتفق نتائج الدراسة مع ما ذكره **إيروين وزملائه** في كندا حيث كانت جميع عينات روث الدجاج المختبرة سلبية لوجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو (**Irwin *et al* ., 1989**). كما تتفق النتائج أيضا مع ما ذكره **بيوتين وزملاءه** في ألمانيا حيث كانت جميع عينات روث الدجاج

المختبرة سلبية لوجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو (**Beutin *et al*., 1993**).

في حين تختلف هذه النتائج مع ما أشار إليه **دويل وسشويني** في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 1.5% في لحوم الدجاج (**Doyle and Schoeni, 1987**). وأيضا ما ذكره **سوذينكل وزملاءه** في تايلاند حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC 1% في لحوم الدجاج مع أنهم في نفس الدراسة أشاروا إلى أن جميع عينات روث الدجاج المختبرة كانت سلبية لوجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو (**Suthienkul *et al* ., 1990**). كما تختلف النتائج مع ما ذكره **سامادبور وزملاءه** في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC 12% في لحوم الدواجن (**Samadpour *et al* ., 1994**). وتختلف النتائج أيضا مع ما ذكره **الصافي والرعوف** في مصر حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 5% في لحوم الدجاج (**الصافي والرعوف، 2003**). كما اختلفت نتائج الدراسة مع ما ذكره **لوكاسوفا وزملاءه** في التشيك حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 في لحوم الدواجن منزوعة العظم 0.9% مع أنهم في نفس الدراسة أشاروا إلى أن جميع عينات ذبائح الدجاج كانت سالبة لوجود الجرثومة (**Lukásová *et al* ., 2004**).

حيث تشير معظم الدراسات إلى أن الدجاج لا يلعب دور الثوي الخازن للإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو، وأن وجود الـ VTEC في هذه اللحوم إنما يشير إلى حدوث تلوث أكيد لهذه اللحوم في متاجر بيع اللحوم والمطاعم بشكل عام، حيث تحتوي هذه الأماكن غالباً على أنواع مختلفة من اللحوم، وهنا تلعب الإجراءات الصحية المتبعة الدور الحاسم (**Suthienkul *et al* ., 1990**) (**Lukásová *et al* ., 2004**). وبرأينا أنّ الدراسات التي أجريت على الدواجن تأتي من ناحية الكميات الكبيرة التي يتم استهلاكها من هذه اللحوم. أو أجريت تقصياً عن أوبئة بالإصابات المترافقة مع الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو (**Samadpour *et al* ., 1994**).

أما بالنسبة لعينات الهمبرغر فقد دلت النتائج على وجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في العينات المفحوصة بنسبة 8% (VTEC Non-O157: 4%, VTEC O157: 4%)، وبينت نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل أن 50% من الذراري المعزولة تملك كلاً من الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 و-2 .

و لم تصل إلى يدنا سوى دراستين أجريتا على وجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو O157:H7 في الهمبرغر. وواحدة منهما كانت تقصياً رجعياً عن وباء بمتلازمة انحلال الدم اليوريمية. في حين أن معظم الأبحاث ركزت على وجود الـ VTEC في اللحوم البقرية المفرومة، وذلك نتيجة العدد المرتفع من الأوبئة التي تترافق مع استهلاكها أولاً، والخطورة الكبيرة التي يشكلها وجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو فيها ثانياً، حيث أن الجرثومة تكون موجودة داخل هذه اللحوم وليس على السطح، ما يعني بأنها تكون محمية من الحرارة نوعاً ما وخاصة في المنتجات الغذائية التي يتم تحضيرها بدون وسط سائل (ماء أو زيت) مثل الهمبرغر، ما يعني بأن تحضيرها يتم بتعرّض للسطح الخارجي للحرارة، وأن لبها غالباً ما يبقى نيئاً وهنا تكمن خطورة استهلاكها. ولذا سنقارن نتائجنا مع الأبحاث التي أجريت على اللحوم البقرية المفرومة، لأنها تشكل المادة الأساسية التي يتكون منها الهمبرغر (**Duffy *et al* ., 2001**).

حيث تتفق هذه النتائج تقريبا مع ما ذكر في كندا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC في اللحوم البقرية المفرومة 5% (VTEC O157 2%، VTEC Non-O157 3%) (**Centers for Disease Control, 1990**). كما تتفق نتاج الدراسة تقريباً مع ما ذكره **سوذينكل وزملاءه** في تايلاند حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC في اللحوم البقرية المفرومة 9% مع أنهم في الدراسة أشاروا إلى خلو عيناتهم من الـ VTEC O157 (**Suthienkul *et al* ., 1990**). كما تتفق نتائج الدراسة تقريبا مع ما ذكره **مورا وزملاءه** في إسبانيا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC في اللحوم البقرية المفرومة 12% (VTEC O157: 1%). كما تتفق النتائج مع ما ذكره **روديس وزملاءه** حيث أشاروا إلى أن متوسط انتشار الـ VTEC O157 في منتجات اللحوم البقرية المعدة للاستهلاك 1.2% (1-17%) (**Rhoades *et al* ., 2009**). كما تتفق النتائج مع ما ذكره **شينين وزملاءه** في الأرجنتين

حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157 في اللحوم البقرية المفرومة 3.8% (**Chinen** *et al* **., 2001**). كما تتفق نتائج الدراسة مع ما ذكره **زهو وزملاءه** في الصين حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157 في اللحوم البقرية المفرومة 5% (**Zhou** ***et al*** **., 2002**).

وكانت نسبة انتشار الجرثومة في هذه الدراسة أقل بكثير مما ذكره **ويلس وزملاءه** في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157 66.6% ويجدر الإشارة إلى أن دراستهم كانت عبارة عن تقصي رجعي عن وباء شديد بمتلازمة انحلال الدم اليوريمية (**Wells** ***et al*** **., 1991**). كما كانت النتائج أقل مما ذكره **بارما وزملاءه** في الأرجنتين حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC في اللحوم البقرية المفرومة 30% (**Parma** ***et al*** **., 2000**). وأيضا كانت النتائج أقل مما ذكره **خان وزملاءه** في الهند حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC في اللحوم البقرية المفرومة 50% (**Khan** ***et al*** **., 2002**). كما كانت النتائج أقل مما ذكره **مورا وزملاءه** في البيرو حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157 19% في اللحوم البقرية المفرومة (**Mora** ***et al*** **., 2007**) . وكانت النتائج أقل أيضا مما ذكره **سيكلا وزملاءه** في كندا حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157 في اللحوم البقرية المفرومة 29% (**sekla** ***et al*** **., 1990**)

كما كانت نسبة الانتشار في هذه الدراسة أكثر من ما ذكره **توتينيل وزملاءه** في بلجيكا حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157 0.2% في لحوم الأبقار المفرومة (**Tutenel** ***et al*** **., 2003**). كما كانت أكثر مما ذكره **لوكاسوفا وزملاءه** في التشيك حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157 0.6% في اللحوم البقرية المفرومة (**Lukásová** ***et al*** **., 2004**). وأكثر مما ذكره **شرويدر وزملاءه** في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC في اللحوم البقرية المفرومة 1% (**Schroeder** ***et al*** **., 2003**). وأكثر أيضاً مما ذكره **كونيديرا وزملاءه** في إيطاليا حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157 في اللحوم البقرية المفرومة 0.4% (**Conedera** ***et al*** **., 2004**). وأيضا كانت النتائج أكثر بقليل مما ذكره **ستامبي وزملاءه** في إيطاليا حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157 2% (**Stampi** ***et al*** **., 2004**)

وتعود الاختلافات بين النتائج لعوامل عديدة، يأتي في أولها درجة الأمن الحيوي الصحي المتبعة في المطاعم ومتاجر بيع اللحوم التي أجريت فيها الدراسات، حيث تتناسب عكساً معها (كلما ارتفعت درجة الأمن الحيوي الصحي قلت نسبة انتشار الجرثومة) (**Suthienkul** ***et al*** **., 1990**) (**Lukásová** ***et al*** **., 2004**). يلي ذلك الموسم حيث تزداد نسبة انتشار الـــ VTEC في فصل الصيف بشكل ملحوظ، والتي تعود لزيادة طرح الجرثومة من الحيوانات الحاملة لها كما ذكر سابقاً (**Centers for Disease Control, 1993**) (**Tutenel** ***et al*** **., 2003**) (**Duffy** ***et al*** **., 2001**)[b]. وبرأينا تلعب نوعية اللحوم التي تم تحضير الهمبرغر منها دوراً مهماً في تحديد نسبة انتشار الـــ VTEC حيث أنها في الغالب تحضر من سقطات الذبيحة (المتنة وغيرها) وليس من اللحوم الحمراء منها وذلك لأن إضافة التوابل هي التي تلعب الدور الحاسم في الطعم وتخفي المصدر الذي تم تحضير اللحوم منه، وغالباً ما تكون هذه الأماكن (المتنة وغيرها) على تماس شديد مع الوسط الخارجي بشكل عام ومحتويات الأمعاء بشكل خاص، بالإضافة لاحتمال حدوث التلوث التصالبي بين الذبائح حيث أن تحضيرها لا يتم من ذبيحة واحدة وإنما من عدة ذبائح (**Bell** ***et al*** **., 1994**). كما تختلف نسبة انتشار الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو باختلاف المنطقة الجغرافية (**Duffy** ***et al*** **., 2001**) [b].

أوضحت نتائج الدراسة وجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في روث الأبقار بنسبة 75% (VTEC Non-O157: 52.5%, VTEC O157: 22.5%)، وهي نسبة مرتفعة جداً حيث تشير إلى كون الأبقار تشكل ثوي خازن رئيسي للإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في الجمهورية العربية السورية. كما أشارت نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد إلى أن 28.6% من الذراري المعزولة تملك كلاً من الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 و-2 في حين أشارت النتائج إلى أن 14.3% من الذراري تملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-2 ، و 57.1% من الذراري تملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1.

وتتفق هذه النتائج تقريباً مع ما ذكره **هيوفلينك وزملاءه** في ألمانيا حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157 6.3% (**Heuvenlink** ***et al*** **., 1998**)، كما تتفق النتائج تقريباً مع

ما ذكره **براديل وزملاءه** في فرنسا حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC في روث الأبقار 70% (**Pradel *et al* ., 2000**). كما تتفق نتائج الدراسة مع ما ذكره **إسلام وزملاءه** في بنغلاديش حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC Non-O157 72.7% و الـــ VTEC O157 7.2% في روث الأبقار (**Islam *et al* ., 2008**).

وكانت نسب الانتشار في هذه الدراسة أكثر مما ذكره **مونتينيغرو وزملائه** في ألمانيا حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC في روث الأبقار 10.8% (**Montenegro *et al* ., 1990**). كما كانت النتائج أكثر مما ذكره **بيوتين وزملاءه** في ألمانيا حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC 21% في روث الأبقار (**Beutin *et al* ., 1993**).كما كانت النتائج أكثر مما ذكره **ستيفان وزملاءه** في ألمانيا حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC في روث الأبقار 12% (**Stephan *et al* ., 2000**). وأكثر أيضا مما ذكره **روجيري وزملاءه** في فرنسا حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC في روث الأبقار 7.9% (**Rogerie *et al* ., 2001**). وكانت النتائج أكثر مما ذكره **ليونغ وزملاءه** في الصين حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC Non-O157 42.8% و الـــ VTEC O157 2.2% في روث الأبقار (**Leung *et al* ., 2001**).كما كانت النتائج أكثر مما ذكره **أوميساكين وزملاءه** حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC في روث الأبقار 40.4% (**Omisakin *et al* ., 2003**). كما كانت النتائج أكثر مما ذكره **غالاهار وزملاءه** في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار نسبة انتشار الـــ VTEC Non-O157 34.3% و الـــ VTEC O157 5.9% في روث الأبقار (**Gallagher *et al* ., 2003**). كما اختلفت النتائج مع ما ذكره **لوكاسوفا وزملاءه** في التشيك حيث كانت جميع عينات روث الأبقار سلبية لوجود الـــ VTEC O157 (**Lukásová *et al* ., 2004**)

وكانت النتائج أقل قليلاً مما ذكره **سوذينكل وزملاءه** في تايلاند حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC 84% في روث الأبقار مع أنهم أشاروا إلى أن عيناتهم كانت خالية من الـــ VTEC O157 في حين أشارت نتائج دراستنا إلى أنها موجودة بنسبة 22.5% (**Suthienkul *et al* ., 1990**). كما كانت النتائج أقل قليلا مما ذكره **إيلدر وزملاءه** في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـــ VTEC O157 في روث الأبقار 28% (**Elder *et al* ., 2000**).

كما كانت النتائج أقل بقليل مما ذكره **شابمان وزملاءه** في المملكة المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 في روث الأبقار 12.9% (**Chapman *et al* ., 2001**).

كانت النتائج أقل أيضاً مما ذكره **ويلس وزملاءه** في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 45% ، والـ VTEC Non-O157 80% في روث الأبقار (**Wells *et al* ., 1991**). وكانت النتائج أقل مما ذكره **بوناردي وزملاءه** في إيطاليا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 في روث الأبقار 17% (**Bonardi *et al* ., 2001**).وكانت النتائج أقل مما ذكره **رينتر وزملاءه** حيث أشاروا إلى أن نسبة انتشار الـ VTEC Non-157 في روث الأبقار 92% في حين اتفقت نتائج الدراسة معهم من حيث نسبة انتشار الـ VTEC O157 8% (**Renter *et al* ., 2004**). كما كانت النتائج أقل مما ذكره **أولونسو وزملاءه** في إيطاليا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 في روث الأبقار 24% (**Alonso *et al* ., 2007**).

و تعود الاختلافات بين النتائج لعوامل عديدة يأتي في أولها الفصل الذي تم جمع العينات فيه، حيث ترتفع صيفاً كما ذكر سابقاً (**Gallagher *et al* ., 2003**). كما يلعب العمر دوراً مهماً في نسبة انتشار الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في روث الأبقار، حيث ترتفع النسبة كلما كانت الحيوانات التي أخذت العينات منها كبيرة بالعمر (**Rhoades *et al* ., 2009**)، بالإضافة لنوع التربية حيث ترتفع في الحيوانات الرعوية أكثر من المعلفة على علائق مركزة (**Duffy, 2005**)، كما يلعب جنس الحيوانات دورا في ذلك حيث نسبة الانتشار في الثيران أعلى منها في الأبقار(**Hussein and Sakuma, 2005**)، كما تلعب المنطقة الجغرافية دوراً في ذلك (**Duffy *et al* ., 2001**)[b].

بينت النتائج وجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في روث الأغنام بنسبة 70% (VTEC Non-O157: 57.5%, VTEC O157: 12.5%). كما بينت نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل أن 28.6% من الذراري المعزولة تملك كلاً من الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 و-2، و 57.1% من الذراري تملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 فقط، في حين بينت النتائج أن 14.3% من الذراري تملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-2 فقط .

وتتفق هذه النتائج عند مقارنتها تقريباً مع ما ذكره بيوتين وزملاءه في ألمانيا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC ‏66.6% ولكنها تختلف من ناحية نسبة انتشار الـ VTEC O157 حيث أشاروا إلى خلو روث الأغنام من هذه الزمرة المصلية (**Beutin** ***et al*** **., 1993**).

وكانت نتائج الدراسة أكثر مما ذكره **هيوفلينك وزملاءه** في ألمانيا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 في روث الأغنام 4% (**Heuvenlink** ***et al*** **., 1998**). كما كانت النتائج أكثر من ما ذكره **ستيفان وزملاءه** في ألمانيا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC ‏29.2% (**Stephan** ***et al*** **., 2000**). كما كانت النتائج أكثر من ما ذكره **شابمان وزملاءه** في المملكة المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC O157 في روث الأغنام 7.4% (**Chapman** ***et al*** **., 2001**). وكانت النتائج أكثر أيضا مما ذكره **حسين وزملاءه** في الولايات المتحدة حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC في روث الأغنام 8.2% (**Hussein** ***et al*** **., 2003**). وكانت النتائج أكثر أيضا مما ذكره **زويفل وزملاءه** في سويسرا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC ‏29.9% في روث الأغنام (**Zweifel** ***et al*** **., 2004**). وأكثر أيضا مما ذكره **دجوجيفيك وزملاءه** في استراليا حيث كانت نسبة انتشار الـ VTEC ‏40% في روث الأغنام (**Djordjevic** ***et al*** **., 2004**). كما تختلف نتائج الدراسة مع ذكره **لينهان وزملاءه** في إيرلندا حيث أشار إلى خلو روث الأغنام من الـ VTEC O157 (**Lenahan** ***et al*** **., 2007**).

وتعود الاختلافات لنفس الأسباب التي ذكرت في نتائج روث الأبقار (**Shekarforoush** ***et al*** **., 2008**) (**Djordjevic** ***et al*** **., 2004**) (**Blanco** ***et al*** **., 2003**) (**Chapman** ***et al*** **., 2001**).

وعند مقارنة نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد مع نتائج اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، تبين أن هناك 78 ذرية إيجابية بالاختبار الأول، في حين أعطت 74 ذرية نتائج إيجابية باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو، حيث تطابقت جميع الذراري الإيجابية باستثناء 4 ذراري أعطت نتائج إيجابية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد وكانت سالبة باختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو (1 ذرية معزولة من روث الأبقار، 3 ذراري معزولة من روث الأغنام). ويمكن

إرجاع ذلك لعدة أسباب، منها عدم وجود تعبير جيني Gene Expression عن الذيفانات في هذه الذراري بالرغم من امتلاكها للجينات المشفرة لها (**Pie´Rard *et al* ., 1997**)، أو فقدان هذه الذراري للجينات المشفرة للذيفانات السامة لخلايا فيرو أثناء تمريرها مخبرياً (**Karch *et al* ., 1992**). أو أنّ عيار Titer الذيفان المنتج من هذه الذراري على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو غير كافي لإحداث التأثير القاتل للذيفان على هذه الخلايا .(**Pollard *et al* ., 1990**)

6- الاستنتاجات

Conclusions

6- الاستنتاجات: Conclusions

1. وجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC بما فيها الزمرة المصلية VTEC O157 في بعض مراحل السلسلة الطعامية في سوريا.
2. امتلاك ذراري الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو لعوامل الضراوة التي تمكنها من التسبب بالأمراض المرافقة لها عند البشر.
3. يعكس وجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في ذبائح الأبقار والأغنام والماعز ضعفاً في مستوى الإجراءات الصحية المتبعة في المسالخ.
4. يشكل تواجد الـ VTEC في الذبائح والعينات الغذائية المختبرة خطراً كامناً على الصحة العامة، ويمكن أن يتعاظم من خلال تداول هذه اللحوم بشكل غير صحي وآمن وخاصة في مطاعم الوجبات السريعة.
5. تشكل الأبقار والأغنام أثوياء خازنة ومهمة للإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في الجمهورية العربية السورية.
6. بالمقارنة بين تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل واختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو في الكشف عن الـ VTEC فإن الطريقة الأولى تحتل الأولوية نظراً لقدرتها على تحديد شاكلة عوامل الضراوة التي تملكها الجرثومة، وتدني التكلفة المادية لها وسرعتها.

7- التوصيات

Recommendations

7- التوصيات: Recommendations

1. تسليط الضوء على وجود الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو بصفتها أحد أهم المسببات المرضية المنقولة بالغذاء في سوريا.
2. تشديد الرقابة الصحية على أماكن بيع اللحوم ومطاعم الوجبات السريعة وفرض إجراءات صحية صارمة على طريقة تعاطي هذه الأماكن مع اللحوم لأن الجرثومة تنتقل بشكل أساسي عن طريق اللحوم غير المطهية بشكل جيد.
3. العمل على خفض مستوى تلوث الذبائح ضمن المسالخ ما أمكن، وذلك برفع درجة الإجراءات الصحية في المسالخ خلال جميع مراحل عملها وخاصة الأخيرة منها (بعد تجويف الذبائح)، وإدخال مرحلة يتم فيها تطبيق بخّاخات البخار أو الماء الساخن لغسل الذبائح أو تعريضها للأحماض العضوية وذلك كنوع من الإجراءات التطهيرية الفعّالة في التخلص من التلوث الزائد من المسببات المرضية بشكل عام والإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو بشكل خاص.
4. الإيعاز لكافة المخابر ذات العلاقة في المحافظات لضرورة جعل اختبارات الكشف عن تواجد الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في المنتجات الغذائية من الاختبارات الروتينية أسوة باختبارات الكشف عن جراثيم السّلمونيلّة والكامبيلوباكتر التي لا تقل عنها أهمية.
5. إجراء دراسات مكملة عن الـ VTEC ، كإجراء دراسة عن مدى تواجد ذراري هذه المجموعة بين البشر المصابين بإسهال مدمى ومتلازمة انحلال الدم اليوريمية ومعرفة الأنماط المصلية لها، وعزل هذه الذراري لإجراء مقارنة بينها وبين الذراري الحيوانية.
6. اعتماد تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد للكشف عن الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو، وذلك نظراً للسرعة والدقة الكبيرة التي تتميز بها وانخفاض التكلفة المادية لها مقارنة مع بقية الطرق.

8- الملخص العربي

Arabic Abstract

8- الملخص العربي

Arabic abstract

تشكل هذه الدراسة أول بحث نوعي في الجمهورية العربية السورية يهدف للتقصي عن الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في أكثر المنتجات الحيوانية تداولاً في السوق السورية (ذبائح، همبرغر ، شاورما دجاج، حليب، جبن) بالإضافة للتقصي عنها في روث كل من الأغنام والأبقار السليمة لمعرفة الدور الذي تلعبه هذه الحيوانات كثوي خازن للإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو.

أجري البحث على 670 عينة تم جمعها المنتجات الحيوانية من المسالخ ومحلات الباعة ومطاعم الوجبات السريعة في كل من محافظتي حماه ودمشق ومنطقة السلمية، كما تم جمع 80 عينة من روث كل من الأغنام والأبقار السليمة، وتم التقصي عن الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو فيها وذلك بإجراء اختبارات الزرع والعزل الجرثومي التقليدية المستخدمة لعزل الإشريكية القولونية بشكل عام، والطرق الخاصة بالكشف عن الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو VTEC O157 نظراً للخطورة التي يشكلها هذا النمط المصلي على الصحة البشرية. وتم بعد ذلك إخضاع جميع عزولات الإشريكية القولونية لكل من اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو للكشف عن التأثير القاتل للذيفان السام لخلايا فيرو، واختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد، وذلك للتقصي عن الجينات المرمزة لكل من الذيفان السام لخلايا فيرو-1 والذيفان السام لخلايا فيرو-2 واللذان يعتبران من أهم عوامل الضراوة التي تملكهما الجرثومة.

تم في هذه الدراسة عزل 78 ذرية من الإشْريكيّة القولونيّة المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو وذلك من 670 عينة تم جمعها من المنتجات الغذائية و 80 عينة روث تم جمعها من الأبقار والأغنام، حيث بلغت نسبة انتشار الـ VTEC 2.9% في العينات الغذائية (VTEC Non-O157: 2.2%, VTEC O157: 0.7%)، وأشارت نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل المتعدد للـ 78 ذرية أن 35 ذرية منها كانت تملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا فيرو-1 فقط (44.9%)، 17 ذرية منها تملك الجين المشفر للذيفان السام لخلايا

فيرو-2 فقط (21.8%)، في حين كانت 26 ذرية منها تملك الاثنين معاً (33.3%). وأشارت نتائج اختبار الزرع على المنبت أحادي الطبقة لخلايا فيرو إلى أن 74 ذرية منها كانت منتجة للذيفانات السامة لخلايا فيرو عند اختبارها.

9- الملخص الانكليزي

English Abstract

9- الملخص الانكليزي

English abstract

Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) is recognized as an important food-borne pathogen, responsible for sporadic cases to serious outbreaks worldwide. The morbidity and mortality associated with several recent outbreaks due to VTEC have highlighted the threat of this organism poses to public health.

Since its discovery in 1982, the organism has been the focus of extensive researches on its epidemiology, pathogenesis, diagnosis, etc. The most important virulent attribute of the VTEC is Verotoxin, The organism may cause serious human complications like Haemolytic Uraemic Syndrome and Haemorrhagic Colitis.

Domestic animals, especially cattle and sheep, are the main reservoirs and sources of infection. Contaminated meat and meat products, dairy products, have been recognized as main vehicles of spread of infection to human. There have been many advances in rapid diagnosis of this infection using the current molecular biology, immunological and cytotoxic methods.

This is the first study carried out in Syria to detect VTEC in the most popular animal's products in the Syrian market (carcasses, hamburger, shawrma, milk, cheese). Beside we detected the pathogen in the faeces of healthy sheep and cattle to know the role which they play as reservoir to VTEC.

We collect 670 samples from slaughters, stores, fast food restaurants, and 80 faeces samples from healthy sheep and cattle, in Salamieh and governorate of Hama and Damascus. All samples were subjected to classical bacteriology examination and isolation applied to isolate *E.Coli* in general, and E.Coli O157 in particular, all *E.Coli* isolates were then passed through Vero Cell Assay to detect the lethal effect of Vero Toxin on this cell line, and multiplex PCR to detect the Vero Toxin genes in the E.Coli strains.

We isolated 78 strains of VTEC from 750 samples. the prevelance of VTEC among the food samples was 2.9% (VTEC Non-O157: 2.2%, VTEC O157: 0.7%). the Multiplex-PCR for 78 strains revealed that 35 strains posses vt_1, 17 strains posses vt_2, 26 posses the both genes.

10- المراجع

References

المراجع العربية: Arabic References

- كردي، عزام؛ الرفاعي، إبراهيم؛ العمر، أنور (2007) : **علم الأحياء الدقيقة العام**، كلية الطب البيطري، جامعة البعث.
- سيد، أمل؛ حسين، أسماء (2003): **مدى تواجد الإشريكية القولونية O157:H7 في الأبقار الحلوب السليمة ظاهريا والألبان المتداولة في السوق المصرية**. كلية الطب البيطري، جامعة أسيوط، مجلة كلية الطب البيطري. المجلد 50، العدد 97.
- مبروك، الصافي (2002): **مدى تلوث الأغذية النمساوية بكل من بكتيريا السلمونيلا وبكتيريا الإشريكية القولونية H7:O157** . المؤتمر الدولي لميكروبيولوجيا الأغذية 2002.
- الصافي، الصافي؛ الرعوف، أسامة (2003): **الكشف عن الإشريكية القولونية O157:H7 في بعض الأغذية المصرية**. كلية العلوم، جامعة الأزهر ، مجلة أسيوط للعلوم الزراعية. المجلد 34، العدد 6.

المراجع الأجنبية:

1. Alonso, S.; Mora, A.; Blanco, M.; Blanco, J.E.; Dahbi, G.; Ferreiro, M.T.; López, C.; Alberghini, L.; Albonetti, S.; Echeita, A.; Trevisani, M. and Blanco, J. (2007): **Fecal carriage of Escherichia coli O157:H7 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy.** Int Microbiol. 10(2):109-16.
2. Arthur, T.M.; Barkocy-Gallagher, G.A.; Barkocy-Gallagher, M.; and Koohmaraie, M. (2002): **Prevalence and Characterization of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on Carcasses in Commercial Beef Cattle Processing Plants.** Applied And Environmental Microbiology.68(10) 4847–4852.
3. Bell, B. P.; Goldoft, M.; Griffin, P. M.; Davis, M. A.; Gordon, D. C.; Tarr, P. I.; Bartleson, C. A.; Lewis, J. H.; Barrett, T. J.; Wells, J. G.; Baron, R. and Kobayashi. J.(1994): **A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers: the Washington experience.** JAMA 272:1349–1353.
4. Beneduce, L.; Spano, G.; Nabi, A.Q.; Lamacchia, F.; Massa, S.; Aouni, R. and Hamama, A. (2008): **Occurrence and characterization of Escherichia coli O157 and other serotypes in raw meat products in Morocco.** J Food Prot. 71(10):2082-6.
5. Benjamin, M.M. and Datta, A.R.(1995): **Acid tolerance of Enterohemorrhagic Escherichia coli.** Appl Environ Microbiol; 61 : 1669-72.
6. Beutin, L.; Geier, D.; Steinruck, H.; Zimmermann, S. And Scheutz, F. (1993): **Prevalence and Some Properties of Verotoxin (Shiga-Like Toxin) Producing Escherichia coli in Seven Different Species of Healthy Domestic Animals** . Journal Of Clinical Microbiology. 31(9) 2483-2488.
7. Bielaszewska, M.; Schmidt, H.; Liesegang, A.; Prager, R.; Rabsch, W.; Tscha¨ Pe, H.; Ci´Zek, A.; Janda, J.; Bla´Hova, K. And Karch, H. (2000) : **Cattle Can Be A Reservoir Of Sorbitol-Fermenting Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli O157:H⁻ Strains And A Source Of Human Diseases** . J. Clin. Microbiol. 38(9): 3470-3473.
8. Blanco, M.; Blanco, J.E.; Mora, A.; Rey, J.; Alonso, J.M.; Hermoso, M.; Hermoso, J.; Alonso, M.P.; Dahbi, G.; Gonza´Lez,

E.A.; Berna'Rdez, M.I. And Blanco, J. (2003): **Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing Escherichia coli Isolates from Healthy Sheep in Spain.** J. Clin. Microbiol. 41(4): 1351-1356.

9. Bonardi, S.; Maggi, E.; Pizzin, G.; Morabito, S. and Caprioli, A. (2001): **Faecal carriage of Verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy.** Int J Food Microbiol, 21;66(1-2):47-53.
10. Bopp, C.A.; Greene, K.D.; Downes, F.P.; Sowers, E.G.; Wells, J.G. and Wachsmuth, I.K. (1987) : **Unusual Verotoxin-Producing Escherichia coli Associated with Hemorrhagic Colitis** . J. Clin. Microbiol. 25(8):1486-1489.
11. Boyce, T. G.; Swerdlow, D. L. and Griffin. P. M. (1995) : **Current concepts: *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome.** N. Engl. J. Med. 333:364–368.
12. Brooks, H.J.; Mollison, B.D.; Bettelheim, K.A.; Matejka, K.; Paterson, K.A. And Ward, V.K. (2001):**Occurrence and virulence factors of non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli in retail meat in Dunedin**, New Zealand. Lett Appl Microbiol, 32(2):118-22.
13. Calderwood, S. B.; Acheson, D. W. K.; Keusch, G. T.; Barrett, T. J.; Griffin, P. M.; Strockbine, N. A.; Swaminathan, B.; Kaper, J. B.; Levine, M. M.; Kaplan, B. S.; Karch, H.; O'Brien, A. D.; Obrig, T. G.; Takeda, Y.; Tarr, P. I. and Wachsmuth, I. K. (1996): **Proposed new nomenclature for SLT (VT) family**. ASM News 62:118–119.
14. Cantey, J. R. and Blake, R. K. (1977) : **Diarrhea due to Escherichia coli in the rabbit: a novel mechanism**. J. Infect. Dis. 135:454-462.
15. Carney, E.; O'Brien, S.B.; Sheridan, J.J.; McDowell, D.A.; Blair, I.S. and Duffy, G. (2006):**Prevalence and level of Escherichia coli O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant**. Food Microbiol. 23(1):52-9.
16. Centre of Disease Control. (1990): Epidemiologic Report: **Verotoxin-Producing Escherichia Coli In Ground Beef In Manitoba** . Can. Med. Assoc. J. 143(6).

17. Centre of Disease Control. (1993). **Update: multistate outbreak Escherichia coli 0157:H7 infections from hamburgers western United States, 1992-1993.** Morbid. Mortal. Weekly Rep. 42:258-263.
18. Centre of Disease Control. (1997) : **Food borne diseases active surveillance network 1996.** Morbid. Mortal. Weekly Rep. 46:258–261.
19. Chahed, A.; China, B.; Mainil, J. and Daube, G. (2006): **Prevalence of Enterohaemorrhagic Escherichia coli from serotype O157 and other attaching and effacing Escherichia coli on bovine carcasses in Algeria.** J Appl Microbiol. 101(2):361-8.
20. Chapman, P.A. (1989): **Evaluation of commercial latex test for identifying Escherichia Coli o157.** J.Clin.Pathol. 43:1109-1110.
21. Chapman, P.A.; Cerdán ; Malo, A.T.; Ellin, M.; Ashton, R. and Harkin. (2001) : **Escherichia coli O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK.** Int J Food Microbiol. 64(2): 39-50.
22. Chinen, I.; Tanaro, J.D.; Miliwebsky, E.; Lound, LH.; Chillemi, G.; Ledri, S.; Baschkier, A.; Scarpin, M.; Manfredi, E. and Rivas, M. (2001): **Isolation and characterizationof *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina.** *J Food Prot*, **64:**1346-1351.
23. Cobbold, R.N.; Davis, M.A.; Rice, D.H.; Szymanski, M.; Tarr, P.I.; Besser, T.E. and Hancock, D.D. (2008): **Associations between bovine, human, and raw milk,and beef isolates of non-O157 Shiga toxigenic Escherichia coli within a restricted geographic area of the United States.** J Food Prot. 71(5):1023-7.
24. Coia, J.E.; Johnston, Y.; Steers, N.J. and Hanson, M.F. (2001): **A survey of the prevalence of Escherichia coli O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland.** Int J Food Microbiol. 66(2):63-9.
25. Conedera, G.; Dalvit, P.; Martn, M.; Galiero, G.; Gramaglia, M.; Goffredo E; Loffredo, G.; Morabito, S.; Ottaviani, D.; Paterlini, F.; Pezzotti, G.; Pisanu, M.; Semprini, P. and Caprioli, A.(2004):

Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *Int J Food Microbiol*, **96**:67-73.

26. Conradi, H.(1903): **Ueber loslishe, durch aseptische Autolyse,erhaltene Giftstoffe von Ruhr- und Typhus bazillen.** Dtsch.Med. Wochenschr. 29:26-28.
27. Cornick, N.A.; Booher, S.L.; Casey, T.A. And Moon, H.W. (2000): **Persistent Colonization of Sheep by Escherichia coli O157:H7 and Other E. coli Pathotypes.** Appl. Environ. Microbiol. 66(11):4926-4939.
28. Djordjevic, S.P.; Ramachandran, V.; Bettelheim, K.A.; Vanselow, B.A.; Holst, P.; Bailey, G. And Hornitzky, M.A. (2004)**: Serotypes and Virulence Gene Profiles of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Strains Isolated from Feces of Pasture-Fed and Lot-Fed Sheep** . Appl. Environ. Microbiol. 70(7):3910-3917.
29. Dorsa, W.; Cutter, C. and Siragusa, G. (1997): **Effects of steam-vacuuming and hot water spray wash on the microflora of refrigerated beef carcass surface tissue inoculated with Escherichia coli O157:H7, Listeria innocua and Clostridium sporogenes.** J Food Prot; 60 : 114-9.
30. Doyle, M.P. And Schoeni, J.L. (1984) : **Survival and Growth Characteristics of Escherichia coli Associated with Hemorrhagic Colitis.** Appl. Environ. Microbiol. 48(4): 855-856 .
31. **Doyle, M. P. and Schoeni. J. L.** (1987): Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. **Appl. Environ. Microbiol. 53(10):**2394–2396.
32. Duffy, G. (2005)**: Verocytoxigenic Escherichia coli in animal faeces, manures and slurries** . Journal of Applied Microbiology. 94: 94–103.
33. Duffy, G.; Garvey, P.; Wasteson, Y.; Coia, J.E. and McDowell, D.A. (2001): **Methods for Verocytotoxigenic *E. coli.* A technical booklet produced for an EU Concerted Action** (CT98-3935). ISBN 1 84170 032 8.[(a)]
34. Duffy, G.; Garvey, P.; Wasteson, Y.; Coia, J.E. and McDowell, D.A. (2001): **Epidemiology of Verocytotoxigenic E. coli. A technical booklet produced for an EU Concerted Action** (CT98-3935). ISBN 1 84170 206 4.[(b)]

35. Elder, R.O.; Keen, J.E.; Siragusa, G.R.; Barkocy-Gallagher, G.A.; Koohmaraie, M. and Laegreid, W.W. (2000): **Correlation of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing.** Proc Natl Acad Sci U.S.A. 97(7):2999-3003.
36. Fagan, P.K.; Hornitzky, M.A.; Bettelheim, K.A. And Djordjevic, S.P. (1999): **Detection of Shiga-Like Toxin (stx1 and stx2), Intimin (eaeA), and Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) Hemolysin (EHEC hlyA) Genes in Animal Feces by Multiplex PCR** . Appl. Environ. Microbiol. 65(2): 868-872.
37. **Farmer, J. J.(** 1995): **Enterobacteriaceae: introduction and identification,** 6th ed. ASM Press, Washington, D.C. 438–449.
38. Fukushima, H.; Hoshina, K. And Gomyoda, M. (1999): **Long-Term Survival of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli O26, O111, and O157 in Bovine Feces** . Appl. Environ. Microbiol. 65(11): 5177-5181.
39. Furst, S.; Scheef, J.; Bielaszewska, M.; Russmanni, H.; Schmidt, H. And Karch, H.(2000): **Identification And Characterisation Of Esherichia Cloi Strains Of O157 Serogroups Containing Three Distinct Shiga Toxin Genes** . J. Med. Microbiol. 49: 383-386.
40. Gallagher, G.A.B.; Arthur, T.M.; Rivera-Betancourt, M.; Nou, X.; Shackelford, S.D.; Wheeler, T.L.; Koohmaraie M. (2003): **Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing Escherichia coli, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and Salmonella in commercial beef processing plants.** J Food Prot, 66(11):1978-86.
41. Gasser, C.; Gautier, E.; Steck, A.; Siebenmann, R. E. and Oechslin, R.(1955) : **Hamolytisch-uramische Syndrome: bilateraleniereninden-nekrosen bei akuten erworbenen hamolytischen Anamien.** Schweiz. Med. Wochenschr. 85:905-909.
42. Griffin, P. M. and Tauxe, R. V. (1991): **The epidemiology of infections caused by Escherichia coli O157:H7, other enterohemorrhagic E. coli, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol.** Rev. 13:60–98.
43. Heuvelink, A.E.; Van-Den-Biggelaar, F.L.A.M.; De Boer, E.; Herbes, R.G.; Melchers, W.J.G.; HuisIn, J.H.J. And Monnens, L.A.H. (1998): **Isolation and Characterization of Verocytotoxin-**

Producing Escherichia coli O157 Strains from Dutch Cattle and Sheep. J. Clin. Microbiol. 36(4): 878-882.

44. Hussein, H. S. and Sakuma, T. (2005): ***Invited Review:*** **Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Dairy Cattle and Their Products.** J. Dairy Sci. 88:450–465.
45. Hussein, H.S.,; Thran, B.H. and Glimp, H.A. (2003): **Verotoxin-producing Escherichia coli in sheep grazing an irrigated pasture or arid rangeland forages.** Exp Biol Med (Maywood). 228(4):358-64
46. Irwin, R.J.; McEwen, S.A.; Clarke, R.C. And Meek, A. (1989) : **The Prevalence of Verocytotoxin-producing Escherichia coli and Antimicrobial Resistance Patterns of Nonverocytotoxin-producing Escherichia coli and Salmonella in Ontario Broiler Chickens**. Can. J. Vet. Res. 53: 411-418.
47. Islam, M.A.; Mondol, A.S.; de-Boer, E.; Beumer, R.R.; Zwietering, M.H.; Talukder, K.A. and Heuvelink, A.E.(2008) : **Prevalence and genetic characterization of shiga toxin-producing Escherichia coli isolates from slaughtered animals in Bangladesh**. Appl Environ Microbiol. 74(17):5414-21.
48. Johnson, R. P.; Clarke, R. C.; Wilson, J. B.; Read, S. C.; Rahn, K.; Renwick, S. A.; Sandhu, K. A.; Alves, D.; Karmali, M. A.; Lior, H.; McEwen, S. A.; Spika, J. S. and Gyles. C. L. (1996): **Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic Escherichia coli.** J. Food Prot. 59:1112–1122.
49. Kalchayanand, N.; Arthur, T.M.; Bosilevac, J.M.; Brichta-Harhay, D.M.; Guerini, M.N.; Shackelford, S.D.; Wheeler, T.L. and Koohmaraie, M. (2007):**Microbiological characterization of lamb arcasses at commercial processing plants in the United States.** J Food Prot. 70(8):1811-9.
50. Karch, H.; T. Meyer; H. Ru¨ssmann, and J. Heesemann. (1992): **Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation**. Infect. Immun. 60:3464–3467.
51. Karmali, M. A. ; Petric, M.; Lim, C. ; Fleming, P. C.; Arbus, G. S. and Lior, H. (1985): **The association between idiopathic**

hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing Escherichia coli. J. Infect. Dis. 151:775-782.[a]

52. Karmali, M.A.; Petric, M. ; Lim, C.; Cheung, R. And Arbus, G.S. (1985): **Sensitive Method for Detecting Low Numbers of Verotoxin-Producing Escherichia coli in Mixed Cultures by Use of Colony Sweeps and Polymyxin Extraction of Verotoxin.** J. Clin. Microbiol. 22(4): 614-619.[b]
53. Karmali, M.A.; Steele, B.T.; Petric, M. and Lim, C. (1983) : **Sporadic cases of Haemolytic-Uraemic Syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing Escherichia coli in stools.** Lancet. 19;1(8325):619-20.
54. Keskimaki, M.; Ikaheimo, R.; Karkkainen, P.; Scheutz, F.; Ratiner, Y.; Puohiniemi, R. and Siitonen, A. (1997): **Shiga toxin-producing Escherichia coli serotype OX3:H21 as a cause of hemolytic-uremic syndrome.** Clin. Infect. Dis. 24:1278–1279.
55. Khan, A.; Yamasaki, S.; Sato, T.; Ramamurthy, T.; Pal, A.; Datta, S.; Chowdhury, N.R.; Das, S.C.; Sikdar, A.; Tsukamoto, T.; Bhattacharya, S.K.; Takeda, Y. and Nair, G.G. (2002): **Prevalence and genetic profiling of virulence determinants of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, beef, and humans, Calcutta, India.** *Emerg Infect Dis.* **8**:54-62.
56. Kibel, M. A. and Barnard, P. J. (1968): **The haemolytic-uraemic syndrome: a survey in Southern Africa.** S. Afr. Med. J. 42:692–698.
57. Konowalchuk, J.; Speirs, J.I. and Stavric, S. (1977) : **Vero Response to a Cytotoxin of Escherichia coli** . Infect. Immun. 18(3):775-779.
58. Krishnan, C.; Fitzgerald, V.A.; Dakin, S.J. And Behme, R.J. (1987): **Laboratory Investigation of Outbreak of Hemorrhagic Colitis Caused by Escherichia coli 0157:H7** . J. Clin. Microbiol. 25(6): 1043-1047.
59. Lenahan, M.; O'Brien, S.; Kinsella, K.; Sweeney, T. and Sheridan, J.J.(2007): **Prevalence and molecular characterization of Escherichia coli O157:H7 on Irish lamb carcasses, fleece and in faeces samples.** J Appl Microbiol. 103(6):2401-9.
60. Leung. P.H.; Yam, W.C.; Ng, W.W. and Peiris, J.S. (2001):**The prevalence and characterization of verotoxin-producing**

Escherichia coli isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong. Epidemiol Infect, 126(2):173-9.

61. Levine, M. M. and Edelman, R. (1984): **Enteropathogenic Escherichia coli of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis**. Epidemiol. Rev. 6:31–51.
62. Lukásová, J.; Abraham, B. and Cupáková, S. (2004): **Occurrence of Escherichia coli O157 in raw material and food in Czech Republic**. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 51(2):77-81.
63. March, S.B. and Ratnam, S. (1986): **Sorbitol-MacConkey Medium for Detection of Escherichia coli 0157:H7 Associated with Hemorrhagic Colitis**. J. Clin. Microbiol. 23(5): 869-872.
64. Martínez, A.J.; Bossio, C.P.; Durango, A.C. and Vanegas, M.C. (2007) : **Characterization of Shiga toxigenic Escherichia coli isolated from foods**. J Food Prot. 70(12):2843-6.
65. Mead, P. S.; Finelli, L.; Lambert-Fair, M. A.; Champ, D.; Townes, J.; Hutwager, L.; Barrett, T.; Spitalny, K. and Mintz, E. (1997): **Risk factors for sporadic infection with *Escherichia coli* O157:H7**. Arch. Intern. Med. 157: 204–208.
66. **Michino, H.; Araki, K.; Minami, S.; Nakayama, T.; Ejima. Y. and Hiroe, K.** (1998): Recent outbreaks of infections caused *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. **ASM**. 73-81.
67. **Montenegro, M.A.; Bulte, M.; Trumpf, T.; Aleksic, S.; Reuter, G.; Bulling, E. And Helmuth, R.** (1990): *Detection and Characterization of Fecal Verotoxin-Producing Escherichia coli from Healthy Cattle* . **J. Clin. Microbiol.** 28(6): 1417-1421.
68. Mora, A.; Blanco, M.; Blanco, J. E.; Dahbi, G.; López, C.; Justel, P.; Alonso, M. P.; Echeita, A.; Bernárdez, M. I.; González, E. A. and Blanco, J. (2007): **Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003**. BMC Microbiology. 7(13): 1471-2180.
69. Mora, A.; León, S.L.; Blanco, M.; Blanco, J.E.; López, C.; Dahbi, G.; Echeita, A.; Gonzlez, E.A. And Blanco, J. (2007): **Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 isolated from raw beef**

meat, soft cheese and vegetables in Lima (Peru). *Int J Food Microbiol*, **114:**204-210.

70. Murphy, M.; Carroll, A.; Whyte, P.; O'Mahony, M.; Anderson, W.; McNamara, E. and Fanning, S.(2005): **Prevalence and characterization of Escherichia coli O26 and O111 in retail minced beef in Ireland**. Foodborne Pathog Dis. 2(4):357-60.
71. Nielsen, E.M; Skov, M.N.; Madsen, J.J.; Lodal, J.; Jespersen, J.B. And Baggesen,D.L.(2004):**Verocytotoxin Producing Escherichia Coli In Wild Birds And Rodents In Close Proximity To Farms.** Appl. Environ. Microbiol. 70(11):6944-6947.
72. O'Brien, A. D. and G. D. LaVeck. (1983): **Purification and characterization of a Shigella dysenteriae 1-like toxin produced by Escherichia coli**. Infect. Immun. 40:675-683.
73. O'Brien, A. D.; Thompson, M. R.; Gemski, P.; Doctor, B. P. and S. B. Formal. (1977): **Biological properties of Shigella flexneri 2A toxin and its serological relationship to Shigella dysenteriae 1 toxin**. Infect. Immun. 15:796-798.
74. O'brien, A.D.; Melton, A.R.; Schmitt, C.K.; Mckee, M.L.; Batts, M.L. and Griffin,D.G (1993): **Profile of Escherichia coli 0157:H7 Pathogen Responsible for Hamburger-Borne Outbreak of Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in Washington** . J. Clin. Microbiol. 31(10): 2799-2810.
75. OIE: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008.
76. Ojeda, A.; Prado, V.; Martinez, J.; Arellano, C.; Borczyk, A.; Johnson, W.; Lior, H. and Levine, M. M. (1995): **Sorbitol-negative phenotype among enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotypes and from different sources.** J. Clin. Microbiol. 33:2199–2201.
77. Omisakin, F.; Macrae, M.; Ogden, I.D. And Strachan, N.J.C. (2003): **Concentration and Prevalence of Escherichia coli O157 in Cattle Feces at Slaughter.** Appl. Environ. Microbiol. 69(5): 2444-2447.
78. Pai, C. H.; R. Gordon, H. V.; Sims, and L. E. and Bryan, M. (1984):**Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with Escherichia coli 0157:H7**. Ann. Intern. Med. 101:738-742.

79. Parma, A.E.; Sanz, M.E.; Blanco, J.E.; Blanco, J.; Vińas, M.R. and Blanco, M. (2000): **Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina.** *Eur J Epidemiol*, **16:**757-762.
80. Pie'Rard, D.; Van Damme, L.; Moriau, L.; Stevens, D. And Lauwers, S. (1997): **Virulence Factors of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Raw Meats**. Appl. Environ. Microbiol. 63(11): 4585–4587.
81. Pierard, D.; Huyghens, L.; Lauwers, S. and Lior, H.: (1991) **Diarrhea associated with Escherichia coli producing porcine oedema disease verotoxin**. Lancet 338:762.
82. Pollard, D.R.; Johnson, W.M.; Lior, H.; Tyler, D. And Rozee, K.R. (1990) : **Rapid and Specific Detection of Verotoxin Genes in Escherichia coli by the Polymerase Chain Reaction.** J. Clin. Microbiol. 28(3): 540-545.
83. Pradel, N.; Livrelli, V.; Champs, C. D.; Palcoux, J.; Reynaud, A.; Scheutz, F.; Sirot, J.; Joly, B.; and Forestier, C. (2000): **Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle, Food, and Children during a One-Year Prospective Study in France**. J. Clin. Microbiol. 38(3): 1023–1031.
84. Quinn, P.J.; Carter, M.E.; Markey, B. and Carter, G.R.(1999): **Clinical Veterinary Microbiology**. Mosby,Elsevier Limited, London, pp.118-126.
85. Rahn, K.; Wilson, J.B.; Mcfadden, K.A.; Read, S.C.; Ellis, A.G.; Renwick, S.A.; Clarke, R.C. And Johnson, R.P. (1996): **Comparison of Vero Cell Assay and PCR as Indicators of the Presence of Verocytotoxigenic Escherichia coli in Bovine and Human Fecal Samples** . Appl. Environ. Microbiol. 62(12):4314-4317.
86. Ratnam, S.; March, S.B.; Ahmed, R.; Bezanson, G.S. And Kasatiya, S. (1988): **Characterization of Escherichia coli Serotype 0157:H7** . J. Clin. Microbiol. 26(10): 2006-2012.
87. Read, S.C.; Gyles, C.L.; Clarke, R.C.; Lior, H.; McEwen, S. (1990): **Prevalence of verocytotoxigenic Escherichia coli in ground beef, pork, and chicken in southwestern Ontario.** Epidemiol Infect.;105(1):11-20.

88. Renter, D.G; Checkley, S.L.; Campbell, J. And King, R. (2004) : **Shiga toxin-producing Escherichia coli in the feces of Alberta feedlot cattle.** Can. J. Vet. Res. 68: 150-153.
89. Rhoades, J.R.; Duffy, G. and Koutsoumanis, K. (2009): **Prevalence and concentration of verocytotoxigenic Escherichia coli, Salmonella enterica and Listeria monocytogenes in the beef production chain: a review.** Food Microbiol. 26(4):357-76.
90. Rigobelo, E.C.; Santo, E. and Marin, J.M. (2008):**Beef carcass contamination by Shiga toxin-producing Escherichia coli strains in an abattoir in Brazil: characterization and resistance to antimicrobial drugs.** Foodborne Pathog. 5(6):811-7.
91. Rigobelo, E.C.; Stella, A.E.; Avila, F.A.; Macedo, C. and Marin, J.M. (2006) : **Characterization of Escherichia coli isolated from carcasses of beef cattle during their processing at an abattoir in Brazil.** Int J Food Microbiol. 110(2):194-200.
92. Riley, L. W.; Remis R. S.; Helgerson, S. D.; McGee H. B.; Wells, J. G.; Davis, B. R.; Hebert, R. J.; Olcott, E. S.; Johnson, L. M.; Hargrett, N. T.; Blake, P. A. and Cohen, M. L. (1983): **Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype.** N. Engl. J. Med. 308:681–685.
93. Rogerie, F.; Marecat, A.; Gambade, S.; Dupond, F.; Beaubois, P. and Lange, M. (2001): **Characterization of Shiga toxin producing E. coli and O157 serotype E. coli isolated in France from healthy domestic cattle.** Int J Food Microbiol, 15;63(3):217-23.
94. Samadpour, M.; Ongerth, J. E.; Liston, J.; Tran, N.; Nguyen, D.; Whittam, T. S.; Wilson, R. A. and Tarr. P. I. (1994): **Occurrence of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington.** Appl. Environ. Microbiol. 60(3):1038–1040.
95. Sandhu, K.S. And Gyles, C.L. (2002): **Pathogenic Shiga toxin-producing Escherichia coli in the intestine of calves** . Can. J. Vet. Res. 66: 65-72.
96. Schroeder, C.M.; White, D.G.; Ge, B.; Zhang, Y.; McDermott, P.F.; Ayers, S.; Zhao, S. and Meng, J. (2003): **Isolation of antimicrobial resistant *Escherichia coli* from retail meats**

purchased in Greater Washington, DC, USA. *Int J Food Microbiol*, **85:**197-202.

97. Sekla, L.; Milley, D. and Stackiw, W. (1990): **Verotoxin-producing *Escherichia coli* in ground beef in Manitoba.** *Can Med Assoc J*,**143:**519-521

98. Shekarforoush, S.; Tahamtan, Y. and Pourbakhsh, A. (2008): **Detection and frequency of Stx2 gene in Escherichia coli O157 and O157:H7 strains isolated from sheep carcasses in Shiraz-Iran.** Pak J Biol Sci. 15;11(8):1085-92.

99. Smith, H.R. And Scotland, S.M.(1993): **Isolation and identification methods for Escherichia coli 0157 and otherVero cytotoxin producing strains.** J. Clin. Pathol. 46: 10-17.

100. Stampi, S.; Caprioli, A.; De Luca, G.; Quaglio, P.; Sacchetti, R. and Zanetti, F.(2004): **Detection of *Escherichia coli* O157 in bovine meat products in northern Italy.** *Int J Food Microbiol*, **90:**257-262.

101. Stephan, R.; Ragettli, S. and Untermann, F. (2000): **Occurrence of verotoxin-producing Escherichia coli (VTEC) in fecal swabs from slaughter cattle and sheep.an observation from a meat hygiene view** .Schweiz Arch Tierheilkd, 142(3):110-4.

102. Suthienkul, O.; Brown, E.; Seriwatana , J.; Tienthongdee , S.; Sastravaha, S.; And Echeverria, P. (1990): **Shiga-Like-Toxin-Producing Escherichia coli in Retail Meats and Cattle in Thailand.** Appl Environl Microbiol. 56 (1) : 1135-1139

103. Tarawneh, K.A.; Al-Tawarah, N.M.; Abdel-Ghani, A.H.; Al-Majali, A.M. And Khleifat, KM. (2009): **Characterization of verotoxigenic Escherichia coli (VTEC) isolates from faeces of small ruminants and environmental samples in southern Jordan.** J Basic Microbiol. 49(3):310-7.

104. Tutenel, A.V.; Pierard, D.; VanHoof. J.; Cornelis, M. and DeZutter, L. (2003): **Isolation and molecular characterization of Escherichia coli O157 isolated from cattle, pigs and chickens at slaughter.** Int J Food Microbiol, 15;84(1):63-9.

105. Walker, C.W.; Upson, R. And Warren, R.E. (1988): **Haemorrhagic colitis: detection of verotoxin producing Escherichia coli 0157 in a clinical microbiology laboratory.** J. Clin. Pathol. 41:80-84.

106. Wani, S. A.; Pandit, F.; Samanta, I.; Bhat, M. A and Buchh, A. S.(2004): **Molecular epidemiology of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* in India**. Current Science. 87(10):1345-1353.

107. Wells, J.G.; Davis, B.R.; Wachsmuth, I.K.; Riley, L.W.; Remis, R.S.; Sokolow, R. And Morris, G.K. (1983): ***Laboratory Investigation of Hemorrhagic Colitis Outbreaks Associated with a Rare Escherichia coli Serotype***. J. Clin. Microbiol. 18(3): 512-520.

108. Wells, J. G.; Shipman, L. D.; Greene, K. D.; Sowers, E. G.; Green, J. H.; Cameron, D. N.; Downes, F. P.; Martin, M. L.; Griffin, P. M.; Ostroff, S. M.; Potter, M. E.; Tauxe, R. V. And Wachsmuth, I. K. (1991): **Isolation of Escherichia coli Serotype 0157:H7 and Other Shiga- Like-Toxin Producing E. coli from Dairy Cattle**. Journal Of Clinical Microbiology. 29(5) : 985-989.

109. Zadik, P. M.; Chapman, P. A. and Siddons, C. A.(1993): **Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli*** O157. J. Med. Microbiol. 39:155–158.

110. Zhou, Z.; Nishikawa, Y.; Zhu, P.; Hong, S.; Hase, A.; Cheasty, T.; Smith, H.R.; Zheng, M. and Haruki, K. (2002): **Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from beef, pork,and cattle fecal samples in Changchun, China.** *J Vet Med Sci*, **64:**1041-1044.

111. Zweifel, C. and Stephan, R. (2003): **Microbiological monitoring of sheep carcass contamination in three Swiss abattoirs**. J Food Prot, 66(6):946-52.

112. Zweifel, C.; Zychowska, M.A. And Stephan, R. (2004): **Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing Escherichia coli, Salmonella spp. and Campylobacter spp. isolated from slaughtered sheep in Switzerland**. Int J Food Microbiol. 1;92(1):45-53.

Al-Baath University
Faculty Of Veterinary Medicine
Microbiology Department

Detection of Verocytoxigenic E.coli in some animal products

Thesis presented
By

Mohammad Abdal Razzak Zahra
post-Dipl.Vet.Med (D.V.M)

for

Master Degree In Vet. Med. Sci.
(Microbiology)

Under the supervision of

Prof. Asso. Dr. Samer Ibrahem
Prof. Asso of Laboratory Diagnostic

2010